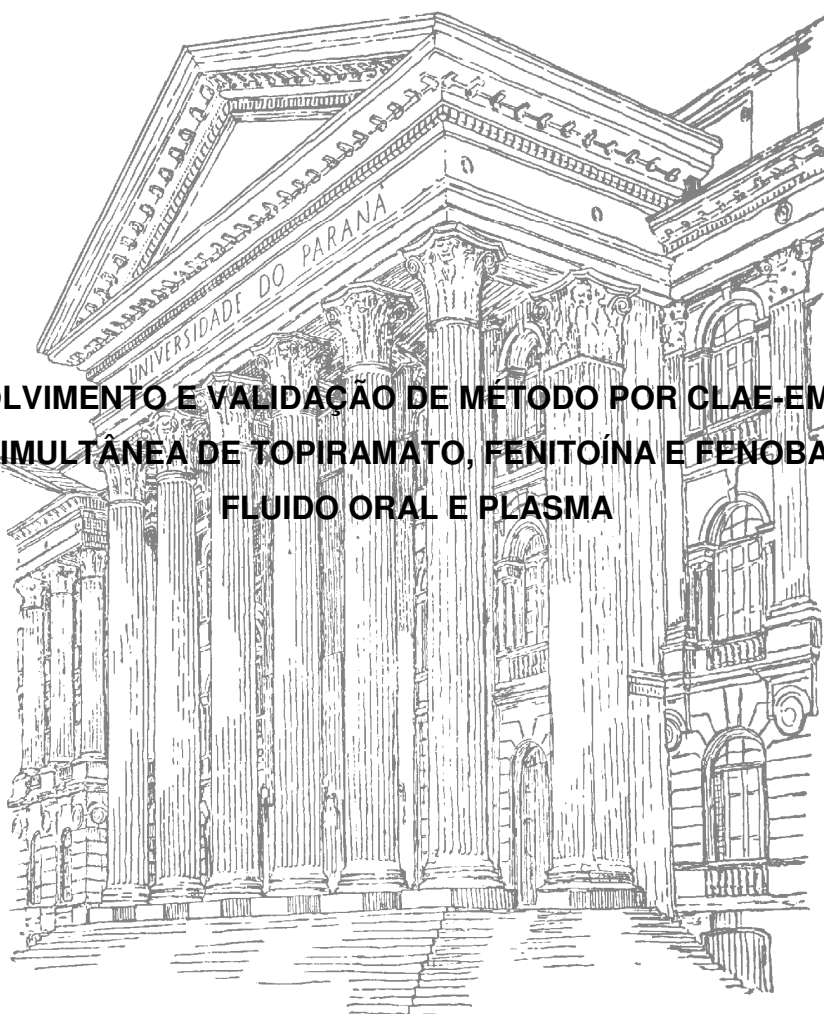


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CIBI AMORIM

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA  
ANÁLISE SIMULTÂNEA DE TOPIRAMATO, FENITOÍNA E FENOBARBITAL EM  
FLUIDO ORAL E PLASMA**



**CURITIBA**

**2014**

JULIANA CIBI AMORIM

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM  
PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE TOPIRAMATO, FENITOÍNA E  
FENOBARBITAL EM FLUIDO ORAL E PLASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Francinete R. Campos  
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

**CURITIBA**

**2014**

Amorim, Juliana Cibi

Desenvolvimento e validação de método por CLAE-EM/EM para análise simultânea de topiramato, fenitoína e fenobarbital em fluido oral e plasma / Juliana Cibi Amorim – Curitiba, 2014.

130 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Francinete R. Campos

Coorientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Topiramato. 2. Anticonvulsivantes. 3. Saliva. 4. Plasma. 5. CLAE-EM/EM. I. Campos, Francinete R. II. Pontarolo, Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1

# TERMO DE APROVAÇÃO

**JULIANA CIBI AMORIM**

**Título: "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE TOPIRAMATO, FENOBARBITAL E FENITOÍNA EM FLUIDO ORAL E PLASMA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Profª. Dra. Francinete Ramos Campos  
Orientadora

  
Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta Zamora  
Universidade Federal do Paraná

  
Profª. Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de fevereiro de 2014.

## RESUMO

A epilepsia é uma doença caracterizada por crises convulsivas, cujo tratamento é realizado com drogas chamadas de anticonvulsivantes. O topiramato é um anticonvulsivante de nova geração que tem seu uso geralmente associado com outros anticonvulsivantes de terapia já bem estabelecida, como fenitoína e fenobarbital. A terapia combinada é uma das formas mais eficazes de controle da doença, porém podem ocorrer interferências na metabolização desses fármacos visto que apresentam a mesma via de metabolização: hepática. Além disso, fatores intrínsecos de cada paciente podem modificar a resposta esperada para cada um dos fármacos, aumentando a incidência de efeitos colaterais. Assim, há a necessidade de desenvolvimento de métodos capazes de monitorar a concentração de topiramato e suas associações na circulação de cada paciente possibilitando o delineamento de protocolos de tratamento individualizados. A saliva surge como matriz ideal para este tipo de análise, uma vez que permite uma coleta simples, fácil e bem aceita para os pacientes. Assim, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) capaz de monitorar as concentrações de topiramato, fenitoína e fenobarbital em matrizes de plasma e saliva. Para isso 30 µL de amostra de plasma e saliva branco foram fortificados com topiramato, fenitoína e fenobarbital, seguido do processo de extração por precipitação de proteína com solução acetonitrila:água (90:10 v/v) contendo 1 mM de formiato de amônio. Posteriormente, foram injetados 20 µL do sobrenadante em um cromatógrafo Agilent 1200 acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo API 3200 da ABSciex, provido de fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operado no modo negativo de ionização. Pelo experimento de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) foram definidas as transições dos íons a serem utilizadas nas análises:  $m/z$  338→78 e  $m/z$  338→96 para o topiramato,  $m/z$  251→102 e  $m/z$  251→77 para fenitoína,  $m/z$  231→85 e  $m/z$  231→188 para o fenobarbital e  $m/z$  357→327 e  $m/z$  357→123 para o padrão interno (prednisona). A separação cromatográfica foi obtida em uma coluna C18 XBridge (150 x 2,1 mm i.d; 5 µm) e pré-coluna (XBridge C18, 10 x 2,1 mm i.d; 5 µm), sendo a fase móvel constituída de solução de  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  1mM pH7,4 (A) e ACN (B) submetidos ao seguinte gradiente de eluição:  $t_{0\text{min.}}$ : 50% A;  $t_{0,01-4,5 \text{ min.}}$ : 25% A;  $t_{4,5-8,5 \text{ min.}}$ : 50% A em um fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. O método desenvolvido foi validado para as matrizes de plasma e saliva, com excelentes resultados de precisão, exatidão e linearidade ( $r > 0,99$ ) para análises na faixa de 2,5 a 300 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato, de 5 a 500 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína e de 50 a 200 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital. Assim, foi disponibilizado um método confiável, simples, rápido e de baixo custo para monitoramento terapêutico de topiramato e associações em matrizes de plasma e saliva.

**Palavras chave:** topiramato, fenitoína, fenobarbital, epilepsia, saliva, plasma, monitoramento terapêutico, CLAE-EM/EM.

## ABSTRACT

Epilepsy is a disorder characterized by seizures and the treatment is performed with drugs called anticonvulsants. Topiramate is an anticonvulsant of new generation which has its use generally associated with other already well established anticonvulsant, such as phenytoin and phenobarbital. Combination therapy is one of the most effective ways to control the disease, but interference may occur in the metabolism of these drugs since they exhibit the same metabolic pathway: liver. In addition, each patient's intrinsic factors can modify the expected response for each drug, increasing the incidence of side effects. Thus, there is a need to develop methods to monitor the concentration of topiramate and their associations in the plasma circulation of each patient allowing the design of individualized treatment protocols. The saliva appears as optimal for this type of array analysis, as it allows a simple, easy and well accepted way to collect samples from the patients. Thus, was developed and validated a method for high efficiency liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) able to monitor the concentrations of topiramate, phenytoin and phenobarbital in plasma and saliva matrices. To this 30  $\mu\text{L}$  of plasma and saliva sample were fortified with topiramate, phenytoin and phenobarbital, followed by the extraction process by protein precipitation solution with acetonitrile: water (90:10 v / v) containing 1 mM ammonium formate. Subsequently, 20  $\mu\text{L}$  of the supernatant was injected into a liquid chromatograph Agilent 1200 coupled to a triple quadrupole mass spectrometer API 3200 ABSciex, equipped with electrospray ionization source (ESI) operated in the negative ionization mode. For the experiment Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions of ions to be used in the analysis were identified:  $m/z$  338  $\rightarrow$  78 and  $m/z$  338  $\rightarrow$  96 for topiramate,  $m/z$  251  $\rightarrow$  102 and  $m/z$  251  $\rightarrow$  77 to phenytoin,  $m/z$  231  $\rightarrow$  85 and  $m/z$  231  $\rightarrow$  188 for phenobarbital and  $m/z$  357  $\rightarrow$  327 and  $m/z$  357  $\rightarrow$  123 for internal standard (prednisone). The chromatographic separation was obtained on a XBridge C18 column (150 x 2.1 mm id, 5 mM) and guard column (XBridge C18, 10 x 2.1 mm id, 5 mM), the mobile phase consisting of a solution of 1 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  pH 7.4 (A) and ACN (B) subjected to the following elution gradient:  $t_{0\text{min}}$ : 50% A;  $t_{0.01-4.5\text{min}}$ : 25% A;  $t_{4.5-8.5\text{min}}$ : 50% A at a flow rate of 0.2  $\text{ml min}^{-1}$ . The method was validated for plasma and saliva matrices, with excellent results of precision, accuracy and linearity ( $r > 0.99$ ) for analysis in the range of 2.5 to 1 to 300  $\text{ng ml}^{-1}$  topiramate, 5 to 500  $\text{ng ml}^{-1}$  and phenytoin from 50 to 200  $\text{ng ml}^{-1}$  of phenobarbital. Thus was provided a reliable, simple, rapid and low cost method for therapeutic drug monitoring of topiramate and associations in plasma and saliva samples.

**Keywords:** topiramate, phenytoin, phenobarbital, epilepsy, saliva, plasma, therapeutic monitoring, LC-MS/MS

*“Renda-se, como eu me rendi.  
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender,  
Viver ultrapassa qualquer entendimento.”*  
(Clarisse Lispector)

*“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho,  
mais sorte eu tenho.”*  
(Thomas Jefferson)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, ponto de fé, sem ele nada seria possível.

À minha querida mãe, por estar sempre do meu lado e ser meu porto seguro quando tudo parecia tão difícil.

Ao meu lindo namorado, Guilherme Telles, por todos os risos, beijos, carinhos, finais de semana e feriados disponibilizados a me ajudar, enfim, por todo apoio, motivação, amor, companheirismo e compreensão que foram fundamentais nessa etapa. Te amo!

À Professora Francinete, por toda a dedicação, paciência e por ter me apresentado o maravilhoso mundo da espectrometria de massas. Muito obrigada por acreditar em mim e tornar o sonho realidade.

Ao Professor Pontarolo por ter me aceitado mesmo sendo uma aluna de “jornada dupla” e por ter disponibilizado toda a estrutura necessária para realização do projeto.

Aos colegas do CEB: Letícia, Caroline Huber, Ana Carolina Gimenez, Raquel, Thaís, João e Rômulo, meu muito obrigada pelo incentivo e auxílio sempre que necessário.

À Vanessa Jasinski, colega de laboratório e ombro amigo nos períodos difíceis, nos colocando mais perto de Deus.

Aos amigos analíticos do Grupo Boticário: Antonieta, Andrea, Carlos, Carolina, Eduardo e Patrícia pelo companheirismo e incentivo quando trabalhar e estudar parecia impossível.

Às minhas queridas amigas Odivânia, Michele, Patrícia e Míriam por serem meu ombro amigo, sempre disponíveis para me motivar. Também agradeço por entenderem toda a minha ausência nos últimos dois anos.



Aos amigos Ruandro, Gisela, Flávia elsabela por todo o incentivo e disponibilidade.

À Sandra Godinho e Ana Lúcia Pereira, pela compreensão e apoio durante este período.

Ao Tiago Martinello, por acreditar em mim e dar o incentivo inicial para que me lançasse nesse projeto.

À Professora Glaucia Martinez por plantar a sementinha da pesquisa em minha vida e me ensinar a amar o mundo analítico.

Ao Hemepar por ceder as bolsas de plasma branco para esta pesquisa.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná pela parceria para o projeto.

Enfim, muito obrigada a todos de que alguma forma contribuíram para que esse sonho pudesse se tornar realidade.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ANTICONVULSIVANTES COMUMENTES UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DE EPILEPSIA: A) TOPIRAMATO B) CARBAMAZEPINA C) FENOBARBITAL D) FENITOÍNA E) ÁCIDO VALPROICO.....	22
FIGURA 2: A POSIÇÃO ANATÔMICA DE DAS TRÊS GLÂNDULAS SALIVARES MAIS IMPORTANTES: A GLÂNDULA PARÓTIDA (1), A GLÂNDULA SUBMANDIBULAR (2) E A GLÂNDULA SUBLINGUAL (3).....	34
FIGURA 3: MÉTODOS DE COLETA DE SALIVA. COLETA PASSIVA (LADO ESQUERDO) E COLETA POR SALIVETTE (LADO DIREITO). ....	38
FIGURA 4: DIAGRAMA DE BLOCOS DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (VAN BRAMER, 1997). ....	40
FIGURA 5: ESQUEMA DE UM EXPERIMENTO DE MRM EM UM ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO. ....	44
FIGURA 6: INFUSÃO DE SOLUÇÃO DE TOPIRAMATO A $800 \text{ ng mL}^{-1}$ PREPARADA EM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA:ÁGUA (50:50, V/V)CONTENDO FORMIATO DE AMÔNIO A 1 MM LOGO APÓS O PREPARO (A) E APÓS UMA HORA DE PREPARO (B).....	64
FIGURA 7: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE FENITOÍNA A $1200 \text{ ng mL}^{-1}$ APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.....	65
FIGURA 8: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE FENOBARBITAL A $15000 \text{ ng mL}^{-1}$ APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.....	66
FIGURA 9: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE TOPIRAMATO A $800 \text{ ng mL}^{-1}$ APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.....	66
FIGURA 10: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE PREDNISONA A $5000 \text{ ng mL}^{-1}$ APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.....	67
FIGURA 11: EXEMPLO DE CROMATOGRAMA OBTIDO DURANTE ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL E TOPIRAMATO NO MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO - TESTE 2 (A) E NO MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE – TESTE 2 (B) .....	70
FIGURA 12: EXEMPLO DE CROMATOGRAMA OBTIDO DURANTE ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL, TOPIRAMATO E PI NO MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE– TESTE 3 SEM AJUSTE DE pH.....	70
FIGURA 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM FENITOÍNA $600 \text{ ng mL}^{-1}$ , FENOBARBITAL $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , TOPIRAMATO $200 \text{ ng mL}^{-1}$ e PI $200 \text{ ng mL}^{-1}$ .....	71
FIGURA 14: TESTE DE SELETIVIDADE EM AMOSTRAS BRANCO DE PLASMA NORMAL (A, B, C, D) DE PLASMA HEMOLISADO (E), DE PLASMA LIPÊMICO (F)	

E DA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL E TOPIRAMATO NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ EM PLASMA (G) ..... 76

FIGURA 15: TESTE DE SELETIVIDADE EM AMOSTRAS DE SALIVA BRANCO OBTIDAS DE CRIANÇAS (A E B), DE ADULTO JOVEM DO SEXO MASCULINO (C), DE ADULTO JOVEM DO SEXO FEMININO (D), DE ADULTO ACIMA DE 50 ANOS DO SEXO MASCULINO (E), DE ADULTO ACIMA DE 50 ANOS DO SEXO FEMININO (F) E DA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL E TOPIRAMATO NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ EM SALIVA (G). ..... 77

FIGURA 16: CROMATROGRAMA DE SINAIS OBTIDOS DE ANÁLISES DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO ANTES DA ANÁLISE DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (A), AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (B), AMOSTRA DE PLASMA BRANCO APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (C E D) E AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LIQ. .... 79

FIGURA 17: CROMATROGRAMA DE SINAIS OBTIDOS DE ANÁLISES DE AMOSTRAS DE SALIVA BRANCO ANTES DA INJEÇÃO DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (A), AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (B), AMOSTRA DE SALIVA BRANCO APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (C E D) E AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LIQ. .... 80

FIGURA 18: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ DE PLASMA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,8 ng mL<sup>-1</sup> PARA A FENITOÍNA (A), 6,6 ng mL<sup>-1</sup> PARA O FENOBARBITAL (B) E DE 0,375 ng mL<sup>-1</sup> PARA O TOPIRAMATO (C) E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).82

FIGURA 19: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ DE SALIVA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,8 ng.mL<sup>-1</sup> PARA A FENITOÍNA (A), 6,6 ng.mL<sup>-1</sup> PARA O FENOBARBITAL (B) E DE 0,375 ng.mL<sup>-1</sup> PARA O TOPIRAMATO (C) E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).83

FIGURA 20: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ PLASMA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 ng mL<sup>-1</sup> PARA A FENITOÍNA (A), 50,0 ng mL<sup>-1</sup> PARA O FENOBARBITAL (B) E DE 2,5 ng mL<sup>-1</sup> PARA O TOPIRAMATO (C) E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).84

FIGURA 21: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ SALIVA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 ng mL<sup>-1</sup> PARA A FENITOÍNA (A), 50,0 ng mL<sup>-1</sup> PARA O FENOBARBITAL (B) E DE 2,5 ng mL<sup>-1</sup> PARA O TOPIRAMATO (C) EM SALIVA E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R)..... 85

FIGURA 22: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM PLASMA, DIA 1 ..... 90

FIGURA 23: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM PLASMA, DIA 1 ..... 90

FIGURA 24: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM PLASMA, DIA 1 ..... 90

FIGURA 25: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM PLASMA, DIA 2 .....	92
FIGURA 26: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM PLASMA, DIA 2.....	0
FIGURA 27: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM PLASMA, DIA 2.....	92
FIGURA 28: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM PLASMA, DIA 3 .....	0
FIGURA 29: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM PLASMA, DIA 3.....	94
FIGURA 30: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM PLASMA, DIA 3.....	94
FIGURA 31: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM SALIVA, DIA 1 .....	96
FIGURA 32: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM SALIVA, DIA 1.....	96
FIGURA 33: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM SALIVA, DIA 1.....	96
FIGURA 34: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM SALIVA, DIA 2 .....	0
FIGURA 35: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM SALIVA, DIA 2.....	98
FIGURA 36: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM SALIVA, DIA 2.....	98
FIGURA 37: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM SALIVA, DIA 3 .....	100
FIGURA 38: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM SALIVA, DIA 3.....	100
FIGURA 39: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM SALIVA, DIA 3.....	100

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS EM PLASMA E EM SALIVA. ....	55
TABELA 2: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA ANÁLISES DE AMOSTRAS DE PLASMA E SALIVA. ....	56
TABELA 3: ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA O MONITORAMENTO EM PLASMA E SALIVA DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL, TOPIRAMATO E PREDNISONA (PI) .....	65
TABELA 4: DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASE MÓVEL TESTADAS PARA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL, TOPIRAMATO E PI NO MODO DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA ISOCRÁTICA.....	68
TABELA 5: DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASE MÓVEL TESTADAS PARA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL, TOPIRAMATO E PI NO MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE.....	69
TABELA 6: COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE ANTICONVULSIVANTES EM TESTES COM DIFERENTES FORMAS DE EXTRAÇÃO EM PLASMA.....	73
TABELA 7: COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE ANTICONVULSIVANTES EM TESTES COM DIFERENTES FORMAS DE EXTRAÇÃO EM SALIVA.....	73
TABELA 8– RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ EM PLASMA.	86
TABELA 9 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ EM SALIVA.	86
TABELA 10: COMPARAÇÃO ENTRE RANGES DE CONCENTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE ANTICONVULSIVANTES EM PLASMA E SALIVA.....	89
TABELA 11: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 1 .....	91
TABELA 12: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 2 .....	93
TABELA 13: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 3 .....	95
TABELA 14: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 1 .....	97
TABELA 15: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 2 .....	99
TABELA 16: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 3 .....	101
TABELA 17: COMPARAÇÃO ENTRE LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO COMPROVADOS PELA LINEARIDADE DO MÉTODO DESENVOLVIDO E MÉTODO DISPONÍVEL NA LITERATURA.....	103
TABELA 18: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 1.....	105

TABELA 19: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 2.....	106
TABELA 20: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 3.....	107
TABELA 21: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 1 .....	108
TABELA 22: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 2 .....	109
TABELA 23: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 3 .....	110
TABELA 24: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS UTILIZANDO MATRIZ PLASMA .....	111
TABELA 25: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS UTILIZANDO MATRIZ SALIVA .....	112
TABELA 26: ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO DOS ANALITOS EM MATRIZ PLASMA. ....	114
TABELA 27: ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO DOS ANALITOS EM MATRIZ SALIVA. ....	115
TABELA 28: ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO	118
TABELA 29: ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE.....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	- Acetonitrila
AMPA	- Receptor de ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANVISA	- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
API	- Ionização a Pressão Atmosférica
APCI	- Atmospheric Pressure Chemical Ionization / Ionização Química a Pressão Atmosférica
CAD	- Collisionally Activated Dissociation/ Dissociação Ativada por Gás de Colisão
CE	- Collision Energy / Energia de Colisão
CEP	- Potencial de Entrada na Cella de Colisão
CLAE	- Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	- Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas e Espectrometria de Massas Sequencial
CME	- Concentração Média Experimental
CQ	- Controle de qualidade
CQA	- Controle de Qualidade Alta Concentração
CQB	- Controle de Qualidade Baixa Concentração
CQD	- Controle de Qualidade de Diluição
CQM	- Controle de Qualidade Média Concentração
CQ - LIQ	- Controle de Qualidade do Limite Inferior de Quantificação
CYP	- Citocromo P450
CV%	- Coeficiente de Variação
CUR	- Curtain gas/ Gás de interface
CXP	- Collision Cell Exit Potential / Potencial de Saída da Cella de Colisão
DC	- Corrente de voltagem
DP	- Desvio Padrão
DPR	- Desvio Padrão Relativo
EP	- Entrance Potential / Potencial de Entrada
EPR	- Erro Padrão Relativo
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por Eletrospray
FIA	- Flow Infusion Analysis / Análise por Infusão em Fluxo
FM	- Fase Móvel
FMN	- Fator Matriz Normalizada por Padrão Interno
FPIA	- Imunoensaio por Polarização Fluorescente
GABA	- Ácido Gama-aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	- Ácido Gama-aminobutírico tipo A

GS1	- <i>Nebulizer Gas</i> / Gás de Nebulização
GS2	- <i>Turbo Gas</i> / Gás Secante
IS	- <i>Ion Spray Voltage</i> / Voltagem do Capilar
LD	- Limite de Detecção
LIQ	- Limite Inferior de Quantificação
LSQ	- Limite Superior de Quantificação
MALDI	- <i>Matrix-assisted laser desorption/ ionization</i> / Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MRM	- <i>Multiple Reaction Monitoring</i> / Monitoramento de Reação Múltipla
<i>m/z</i>	- Relação Massa Carga
NMDA	- Receptor de N-metil-D-aspartato
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PI	- Padrão Interno
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RF	- Radiofrequência
SPE	- <i>Solid phase extration</i> / Extração em Fase Sólida
SQRs	- Substâncias Químicas de Referência



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2 OBJETIVOS</b>	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
3.1 EPILEPSIA	21
3.2 TOPIRAMATO	22
3.2.1 Mecanismo de Ação	23
3.2.2 Farmacocinética:	23
3.2.3 Eliminação:	24
3.2.4 Associações:	24
3.2.4.1 Topiramato e Carbamazepina	25
3.2.4.2 Topiramato e Fenobarbital	25
3.2.4.3 Topiramato e Fenitoína	25
3.2.4.4 Topiramato e Ácido Valproico	26
3.2.5 Efeitos Colaterais do Topiramato	26
3.2.5 Metodologias de Análise de Topiramato:	27
3.2.6 Análise de Topiramato em Saliva	28
3.3 FENOBARBITAL	28
3.3.1 Características Farmacocinéticas	29
3.3.2 Análise de Fenobarbital em Saliva	29
3.4 FENITOÍNA	30
3.4.1 Características Farmacocinéticas	30
3.4.2 Análise de Fenitoína em Saliva	31
3.4 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO	31
3.4.1 Monitoramento Terapêutico de Anticonvulsivantes	31
3.5 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DA SALIVA	33
3.5.1 Composição Salivar	36
3.5.2 Coleta de Saliva	37
3.6 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO POR CLAE-EM/EM	38
3.6.1 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas utilizando recursos de Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM)	39
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	44

3.7.1 Especificidade .....	44
3.7.2 Efeito residual.....	45
3.7.3 Efeito matriz .....	46
3.7.4 Linearidade.....	46
3.7.5 Precisão .....	48
3.7.6 Exatidão .....	48
3.7.7 Estudo de Estabilidade.....	49
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES.....	51
4.2 OBTENÇÃO DE PLASMA E SALIVA.....	51
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	51
4.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTROMETRO DE MASSAS.....	52
4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	53
4.6 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA E SALIVA BRANCOS FORTIFICADOS.....	53
4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	54
4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	57
4.8.1 Seletividade.....	57
4.8.2 Efeito Matriz .....	58
4.8.3 Linearidade e Controles de Qualidade .....	58
4.8.4 Precisão e Exatidão .....	59
4.8.5 Efeito Residual ( <i>Carryover</i> ) .....	59
4.8.6 Estabilidade.....	60
4.8.6.1 Estabilidade de Curta Duração, Pós-Preparativa, após Ciclos de.....	60
Congelamento e Descongelamento e de Longa Duração .....	60
4.8.6.2 Estabilidade das Soluções Estoque e de Trabalho .....	60
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	62
5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CLAE-EM/EM .....	67
5.3 EXTRAÇÃO DOS ANTICONVULSIVANTES DO PLASMA E SALIVA BRANCOS FORTIFICADOS.....	72
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	74
5.4.1 Seletividade.....	75
5.4.2 Efeito Residual .....	78

5.4.3 Limite inferior de detecção (LID) e de quantificação (LIQ) .....	81
5.4.4 Efeito Matriz .....	86
5.4.5 Linearidade.....	88
5.4.6 PRECISÃO E EXATIDÃO .....	103
5.4.7.1 Estabilidade de Curta Duração, Pós-Processamento, após Ciclos de Congelamento e Descongelamento e de Longa Duração.....	113
5.4.7.2 Estabilidade das Soluções Estoque e de Trabalho .....	116
5.5 CONCENTRAÇÃO DE TOPIRAMATO E ASSOCIAÇÕES EM PLASMA E SALIVA.....	120
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES .....</b>	<b>122</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>124</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença que atinge milhões de pessoas pelo mundo, sendo caracterizada pela ocorrência de crises convulsivas frequentes, provocadas por eventos de atividade neuronal excessiva ou pela falta de sincronia no momento da transmissão do impulso nervoso (BANERJEE *et al.*, 2009). Não há uma cura para a doença, o tratamento com medicamentos objetiva apenas reduzir o número de crises convulsivas com consequente melhora na qualidade de vida do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O Topiramato é uma droga anticonvulsivante que tem demonstrado grande eficácia no tratamento da epilepsia, principalmente nas caracterizadas por crises convulsivas parciais (ROSENFELD, 1997). Além disso, sua utilização é promissora para o tratamento de inúmeros outros problemas psiquiátricos (ARNONE, 2005). Por ainda ser considerado um anticonvulsivante de nova geração pela classe médica, sua utilização clínica geralmente é associada com fármacos já bem estabelecidos na terapia anticonvulsivante, como fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e ácido valpróico. Porém, em todos esses casos já foi constatada influência da associação na concentração plasmática esperada para cada um dos medicamentos (ROSENFELD, 1997). Isso se deve ao fato da metabolização dos fármacos anticonvulsivantes ser geralmente hepática e facilmente influenciada tanto por fatores intrínsecos do paciente, quanto pelos próprios fármacos em associação (ROSENFELD, 1997), o que faz com que o uso de terapias combinadas eleve o risco do surgimento de interações farmacocinéticas e efeitos colaterais para os pacientes.

Uma série de efeitos colaterais envolvendo o sistema nervoso central já foram relacionados com o uso excessivo de topiramato tais como tontura, sonolência e depressão (PRIVITERA, 1997; SMITH *et al.* 2001). Porém um efeito adverso colateral que veem preocupando cada vez mais a classe médica é o aumento da frequência de formação de cálculos renais, sendo estimado um risco 10 vezes maior de formação do que em uma população normal que não está em tratamento (JONES, 1998; SMITH *et al.*, 2001).

Diante do exposto existe uma dificuldade na definição de um protocolo de tratamento único para todos os pacientes sem severas consequências sobre a

qualidade de vida dos mesmos. Faz-se necessário, então, um correto monitoramento da concentração de topiramato na corrente sanguínea, tornando possível o ajuste de dose necessária para manter os efeitos esperados do fármaco sobre a saúde de cada paciente sem riscos de surgimento de efeitos colaterais. O monitoramento terapêutico é hoje uma das ferramentas mais eficazes para a definição de um protocolo clínico adequado para cada paciente (PATSALOS *et al.*, 2008).

Os métodos usuais de monitoramento terapêutico consideram principalmente o uso de matrizes biológicas tradicionais, como sangue e urina, para a realização deste tipo de estudo. Porém, como há a necessidade de um grande número de coletas em um curto intervalo de tempo, a utilização de sangue se torna muito penosa ao paciente, enquanto a utilização de urina não seria a mais indicada, pelo fato da quantificação do fármaco ser realizada através dos metabólitos gerados e não da forma ativa circulante no organismo do paciente.

O surgimento de ferramentas analíticas bastante sensíveis e específicas como a Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas permitiram o uso de fluídos orais como alternativa de matriz biológica para análise e monitoramento de ativos, apresentando várias vantagens sobre as matrizes consideradas tradicionais (CHOO; HUESTIS, 2004). Com a utilização de saliva como matriz biológica para este tipo de análise se tem uma coleta de amostra rápida, não invasiva, sendo menos desagradável para os pacientes e mais fácil em indivíduos nos quais o acesso venoso é dificultado, como idosos e crianças. Fluídos orais contêm vários dos analitos presentes no plasma, sendo que já existem estudos que comprovam que muitos anticonvulsivantes refletem de maneira direta a fração livre de fármacos presentes na circulação (CHOO; HUESTIS, 2004; PATSALOS *et al.*, 2013).

Há vários métodos disponíveis para monitoramento terapêutico de fármacos anticonvulsivantes, tanto na corrente sanguínea quanto em saliva, porém a maioria é capaz de monitorá-los apenas de forma isolada, além de apresentarem interferência de matrizes biológicas complexas, no processo chamado de efeito matriz, e um limite de detecção alto (KANGI *et al.*, 2011). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de um método de análise rápido e sensível capaz de monitorar a concentração plasmática em diferentes matrizes biológicas tanto do topiramato, quanto de medicamentos ao qual sua terapia é associada.

Neste sentido, propõe-se o desenvolvimento e validação de um método de análise sensível e específico capaz de quantificar topiramato, fenitoína e fenobarbital em fluído oral e plasma, a fim de auxiliar na definição de protocolos clínicos de tratamento de epilepsia específicos para cada paciente. Para isso será utilizada a ferramenta analítica cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

O objetivo é disponibilizar um método de análise simples e rápido para o monitoramento terapêutico destes fármacos que possa ser aplicado na rotina de laboratórios clínicos e orientar a dosagem adequada de topiramato e algumas de suas associações para cada paciente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar uma metodologia analítica rápida, simples e sensível por CLAE-EM/EM para a quantificação de anticonvulsivantes (topiramato, fenobarbital e fenitoína) em fluidos orais e plasma. O intuito é auxiliar na definição de protocolos clínicos de tratamento de epilepsia específicos para cada paciente, melhorando a qualidade de vida dos mesmos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver métodos analíticos de extração simultânea de topiramato, fenobarbital e fenitoína de amostras de plasma e fluído oral;
- Otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas e da cromatografia a líquido acoplada ao espectrômetro de massas.
- Validar os métodos desenvolvidos de extração e quantificação por CLAE-EM/EM utilizando a RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos.
- Quantificar simultaneamente topiramato, fenobarbital e fenitoína em amostras de plasma e fluído oral por CLAE-EM/EM de pacientes com epilepsia.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 EPILEPSIA

Epilepsia é uma doença neurológica bastante comum, afetando cerca de 50 milhões de pessoas no mundo. É caracterizada por crises de atividade neuronal excessiva ou pela falta de sincronia na transmissão do impulso nervoso, que ocasiona as chamadas crises convulsivas. De acordo com a Liga Internacional contra a Epilepsia, as convulsões epiléticas podem ser classificadas em dois tipos: as crises parciais e as crises generalizadas. A epilepsia caracterizada por crises parciais é aquela em que as convulsões começam em uma área específica do cérebro, podendo haver ou não alteração de consciência no paciente. Já na epilepsia caracterizada por convulsões generalizadas, a convulsão ocorre em todo o cérebro simultaneamente (BANERJEE *et al.*, 2009).

Não existe uma cura para a epilepsia. O objetivo do tratamento é propiciar ao paciente a melhor qualidade de vida possível através de um adequado controle de crises, com um mínimo de efeitos adversos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A determinação do tipo específico de crise e da síndrome epilética é fundamental para a escolha do tratamento adequado para cada paciente, uma vez que os mecanismos de geração e propagação de crise diferem em cada situação, e os fármacos anticonvulsivantes agem por diferentes mecanismos que podem ou não ser favoráveis ao tratamento (PERUCCA, 2005). Os fármacos anticonvulsivantes atuam através de um ou de vários dos seguintes mecanismos:

- Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem;
- Inibição de corrente de cálcio;
- Potencialização do ácido gama-aminobutírico (GABA);
- Antagonismo com glutamato;
- Inibição da anidrase carbônica;
- Ou através de mecanismos desconhecidos (ROGAWSKI; LOSCHER, 2004).

Hoje, os fármacos mais comumente recomendados para o tratamento da epilepsia são os já bem estabelecidos carbamazepina, fenitoína, e ácido valproico e os chamados de novos anticonvulsivantes lamotrigina e topiramato (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).



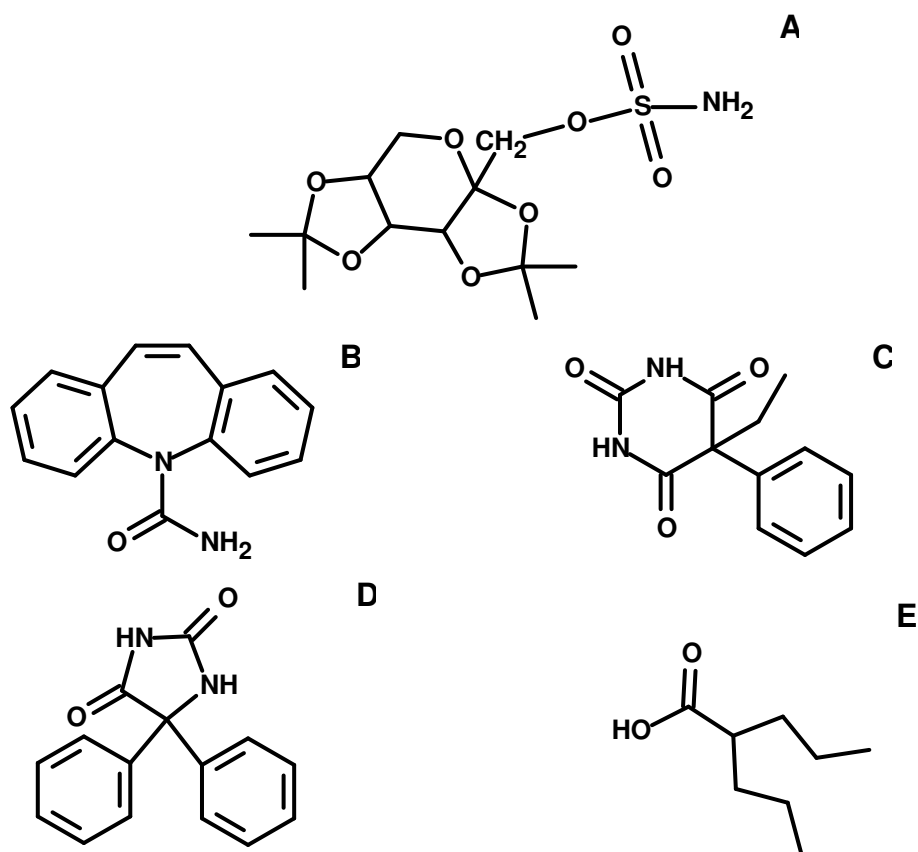


FIGURA 1: ANTICONVULSIVANTES COMUMENTES UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DE EPILEPSIA: A) TOPIRAMATO B) CARBAMAZEPINA C) FENOBARBITAL D) FENITOÍNA E) ÁCIDO VALPROICO.

### 3.2 TOPIRAMATO

O Topiramato é considerado uma droga antiepiléptica de nova geração. É um derivado de monossacarídeos com uma função sulfamato (2,3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene)-B-D-fructopyranosesulfamate), o que o distingue dos outros anticonvulsivantes (ROSENFELD, 1997). Tem-se demonstrado eficaz principalmente no tratamento de convulsões parciais, tanto em crianças como em adultos. Além disso, sua utilização é promissora para uma variedade de outras doenças não epiléticas, como distúrbio bipolar, tremor essencial, neuralgia do trigêmeo, dores de cabeça do tipo “cluster”, prevenção da enxaqueca e compulsão e transtornos alimentares (MILES *et al.*, 2003).

Esta droga foi descoberta em 1987 em um protocolo de rastreio usando teste de padrão de eletrochoque máximo de apreensão, onde mostrou efeitos similares a carbamazepina e fenitoína, sendo que em estudos em animais, apresentou um

padrão toxicológico mais seguro que as demais drogas (PATSALOS; SANDERS, 1994).

### 3.2.1 Mecanismo de Ação

Várias propriedades farmacológicas do topiramato podem estar relacionadas à sua ação anticonvulsivante.

Primeiramente, o topiramato atua potencializando a atividade do neurotransmissor inibitório GABA. Em células granulares cerebelares, o topiramato demonstrou aumentar o fluxo de íons cloreto mediado pelo receptor Ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA<sub>A</sub>) (BROWN *et al.*, 1993). Assim, pesquisadores sugerem que o topiramato pode potencializar a corrente de GABA, por uma interação com os receptores GABA<sub>A</sub>ionóforos. Essa ação assemelha-se a de barbitúricos e benzodiazepínicos, porém diferentemente dos barbitúricos, o topiramato não aumenta o tempo em que o canal fica aberto, nem tão pouco tem seu efeito bloqueado com o uso de flumazenil, que é um antagonista do efeito dos benzodiazepínicos (WHITE *et al.*, 1995).

Sua segunda atividade está relacionada à modulação da condutividade de canais sódio dependentes que geram potenciais de ação. Este efeito é percebido com o uso de outras drogas, como a fenitoína e a lamotrigina. Esta atividade do topiramato é resultado da observação de Sombati e colaboradores, que o fármaco é capaz de provocar redução reversível nos episódios epileptiformes na concentração de 10 a 100 µM (SOMBATI, 1995).

E por último, o topiramato parece apresentar efeito antagonista sobre os receptores glutamatos do subtipo kainato/AMPA, sendo que não apresenta nenhum efeito sobre os receptores de glutamato do tipo NMDA. O bloqueio da corrente de kainato já é um conhecido mecanismo pelo qual a excitabilidade neuronal pode ser reduzida (SERVETI *et al.*, 1995).

### 3.2.2 Farmacocinética:

A absorção do topiramato via oral é rápida e praticamente completa, alcançando seu pico plasmático em aproximadamente duas horas após a

administração (NAYAK *et al.*, 1994). Sua biodisponibilidade é cerca de 80%, sendo sua ligação as proteínas plasmáticas de 15% (SCHNEIDERMAN, 1998). Cerca de 70% da dose administrada é eliminada inalterada pela urina, o restante é metabolizado no fígado por isoenzimas CYP ainda não identificadas, sendo que seis metabólitos inativos formados por hidroxilação, hidrólise e glucoronidação já foram identificados (ROSENFELD, 1997).

De acordo com pesquisas recentes, existe uma correlação variável entre dosagem e concentração plasmática de topiramato. Alguns pacientes inesperadamente apresentam uma baixa ou alta dosagem do fármaco, independente da dosagem administrada. Numerosos fatores como co-tratamento com drogas indutoras de enzimas hepáticas, comprometimento hepático, idade e fatores perinatais podem afetar a relação entre dose-concentração de topiramato (MILES *et al.*, 2003).

### 3.2.3 Eliminação:

A excreção renal é a rota majoritária de eliminação de topiramato inalterado e seus metabólitos. Seu *clearance* plasmático é de cerca de 20 a 30 mL.min<sup>-1</sup>, sendo sua meia vida de eliminação de cerca de 21 horas. O mecanismo de eliminação renal de topiramato envolve reabsorção tubular renal (ROSENFELD, 1997).

### 3.2.4 Associações:

Há uma necessidade cada vez maior de medicamentos que tratem de maneira efetiva a epilepsia e apresentem a menor toxicidade possível. As terapias mais tradicionais não conseguem controlar as crises convulsivas em cerca de 25% dos pacientes, sendo necessária muitas vezes o uso combinado de dois ou mais agentes anticonvulsivantes. Porém, o uso de terapias combinadas eleva o risco de surgimento de interações farmacocinéticas e efeitos colaterais (ROSENFELD, 1997).

#### 3.2.4.1 Topiramato e Carbamazepina

A carbamazepina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da epilepsia. Ele atua nos canais de sódio dependentes de voltagem, deixando as células menos excitáveis. Além disso, já demonstrou potencializar os receptores GABA<sub>A</sub> (GRANGER *et al.*, 1995).

Estudos demonstram que o topiramato não afeta a concentração plasmática da carbamazepina. Porém já existem indícios de que a concentração plasmática de topiramato pode aumentar em cerca de 70% com o uso associado com carbamazepina, sendo que sua meia vida plasmática fica reduzida em 40% (ROSENFELD, 1997).

#### 3.2.4.2 Topiramato e Fenobarbital

Fenobarbital é um barbiturico, sendo o anticonvulsivante mais antigo e amplamente utilizado no tratamento da epilepsia. Seu efeito está relacionado à indução dos receptores GABA<sub>A</sub> e bloqueio dos receptores AMPA relacionados ao glutamato (HARRISON, 2000).

Assim como a carbamazepina, o fenobarbital não tem sua concentração plasmática influenciada pela co-terapia com o topiramato, porém eleva a concentração plasmática do segundo fármaco, reduzindo o tempo de meia vida plasmático do mesmo (ROSENFELD, 1997).

#### 3.2.4.3 Topiramato e Fenitoína

A fenitoína é um antiepiléptico, cujo principal mecanismo de ação é o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, o que lhe confere grande eficácia contra crises epiléticas de início focal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Durante um tratamento associado de topiramato com fenitoína, foi observado que a concentração plasmática de topiramato ficou reduzida em 50%, enquanto a de fenitoína apresentou-se 25% mais elevada (ROSENFELD, 1997).

#### 3.2.4.4 Topiramato e Ácido Valpróico

O ácido valproico é um dos principais anticonvulsivantes utilizados, com eficácia estabelecida para múltiplos tipos de crises convulsivas. Seu mecanismo de ação pode envolver redução na frequência de disparos dos canais de sódio dependentes de voltagem, ativação da condutância do potássio e, possivelmente, ação direta sobre outros canais iônicos. É sabido que o ácido valpróico tem um efeito GABAérgico através da elevação do GABA cerebral por diversos mecanismos: inibição da GABA-transaminase, aumento das enzimas sintetizadoras do GABA, aumento da liberação e inibição da recaptação do GABA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Estudos demonstraram que durante a associação com topiramato, ambos os fármacos sofrem redução na sua concentração plasmática, sendo que o topiramato decresce em 14% e o ácido valpróico 11%(ROSENFELD, 1997).

#### 3.2.5 Efeitos Colaterais do Topiramato

Como na maioria dos medicamentos anticonvulsivantes grande parte dos efeitos colaterais do topiramato envolvem o sistema nervoso central. Os efeitos colaterais mais comuns que ocorrem em mais de 10% dos pacientes em tratamento são tonturas, retardamento mental, sonolência, ataxia, fadiga, confusão, incapacidade de concentração e parestesias (PRIVITERA, 1997; SMITH *et al.*, 2001). Também é relatado por muitos pacientes um estado de confusão mental, caracterizado por lentidão de pensamentos e uma série de sintomas relacionados, como diminuição da cognição, dificuldade na realização de cálculos, confusão mental, respostas lentas e dificuldade de concentração (JONES, 1998). Estudos associam essas alterações nos efeitos cognitivos com a utilização de doses mais altas de topiramato ou o aumento brusco de dose do medicamento. Outros efeitos colaterais já reportados na literatura incluem cansaço, nervosismo e depressão (JONES, 1998; SHOVIION,1996).

Efeitos colaterais sistêmicos comuns como erupção cutânea, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e anemia aplástica não foram relatados em pacientes em terapia com o topiramato (JONES, 1998).

Uma constatação bastante interessante em estudos clínicos com o uso de topiramato é que mais de 20% dos pacientes em tratamento com o medicamento apresentam uma suave perda de peso, sendo esta maior em pacientes obesos ou que utilizam altas concentrações de topiramato (JONES, 1998; SHOVIION,1996).

Um efeito colateral que vêm preocupando bastante a classe médica é o aumento da frequência de formação de cálculos renais em pacientes em tratamento com topiramato. É estimado que 1,5% dos pacientes apresentam este tipo de problema, sendo este risco 10 vezes maior do que em uma população normal que não está em tratamento (JONES, 1998; SMITH *et al.*, 2001).

### 3.2.5 Metodologias de Análise de Topiramato:

A primeira técnica desenvolvida para análise de topiramato foi à cromatográfica gasosa, em 1988 por Holland e colaboradores. A técnica já foi utilizada para monitoramento da concentração do fármaco em soro e plasma, passando por algumas revisões nos últimos anos, porém seu limite de quantificação é de no máximo  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , impossibilitando o monitoramento da concentração do fármaco nos momentos iniciais de administração. A cromatografia gasosa foi utilizada para a padronização da técnica mais utilizada atualmente, o Imunoensaio por Polarização Fluorescente (FPIA). A FPIA já se mostrou bastante eficiente para monitoramento de topiramato em soro, plasma, saliva e urina. Embora seja o método mais prático por já haverem *kits* comerciais prontos para a análise, é uma técnica cara e já foi apontada interferência de metabólitos no doseamento de topiramato. Além disso, seu limite de quantificação é o maior entre todas as técnicas, em torno de  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (BERRY; PATSALOS, 2000; CHRISTENSEN *et al.*, 2002; BAHRAMI *et al.*, 2007).

Métodos utilizando Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplado a detector de fluorescência (BAHRAMI *et al.*, 2004, 2007) e de ultravioleta (BAHRAMI *et al.*, 2005) também já foram apresentados, requerendo um longo processo de derivatização, uma vez que o topiramato não apresenta absorção fluorescente ou ultravioleta.

Para a determinação rápida e seletiva de topiramato, a cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas tornou-se a técnica preferida. Esta técnica

tem sido utilizada para monitoramento do fármaco e de seus metabólitos em plasma, soro, urina e fluído cérebro espinhal, com um limite de detecção que chega a 10 ng mL<sup>-1</sup>. Assim como para o topiramato, existem vários métodos já desenvolvidos e validados para análise isolada dos diversos anticonvulsivantes utilizados no tratamento da epilepsia (KANGI *et al.*, 2011). Porém, em co-terapias se torna bastante importante o monitoramento da concentração circulante de cada fármaco, uma vez que já existem forte indícios que a concentração de cada ativo depende do fármaco ao qual está associado e hoje há pouco métodos desenvolvidos neste sentido. Além disso, devem-se buscar métodos de avaliação de fármacos com o uso de matrizes biológicas menos complexas e de mais fácil acesso, como a saliva.

### 3.2.6 Análise de Topiramato em Saliva

Existe apenas um estudo que investiga a distribuição de topiramato na saliva e sua correlação de distribuição saliva/plasma em crianças e adultos com epilepsia. Utilizou-se o método de FPIA e verificou-se que o topiramato se distribui na saliva de tal forma que sua concentração salivar é semelhante a sua concentração plasmática, com razão de distribuição saliva/plasma média de 0,9 ( $\pm 0,12$ ) e uma correlação de  $r^2=0,97$  (MILES *et al.*, 2003). Estes dados demonstram que a quantificação de topiramato em saliva é possível, assim como existe uma estreita relação entre a quantidade encontrada nessa matriz e a concentração plasmática do analito.

## 3.3 FENOBARBITAL

Fenobarbital é o anticonvulsivante mais antigo, foi introduzido na terapia antiepiléptica em 1912 e ainda é amplamente utilizado como medicamento anticonvulsivante. Seu efeito está relacionado à indução dos receptores GABA<sub>A</sub> e bloqueio dos receptores AMPA relacionados ao glutamato (HARRISON, 2000). O fenobarbital é utilizado isoladamente ou em co-terapias no tratamento de todas as formas de epilepsia, principalmente as caracterizadas por crises convulsivas parciais, tônico-clônicas e neonatais (MATTSON *et al.*, 1985; PATSALOS *et al.*, 2013). Em países de melhor qualidade de vida, o fenobarbital é o medicamento de

escolha para crianças e neonatos, enquanto em países de terceiro mundo é utilizado amplamente por pacientes de todas as idades, uma vez que apresenta uma boa efetividade e baixo custo (TREVATHAN; MEDINA, 1998). Este medicamento está disponível em uma ampla variedade de formulações, incluindo comprimidos, soluções intravenosas e elixires (PATSALOS *et al.*, 2013).

### 3.3.1 Características Farmacocinéticas

O fenobarbital é rapidamente absorvido após ingestão oral com um  $T_{\text{máx.}}$  de 2-4 horas e biodisponibilidade maior que 90%. Sua farmacocinética é linear e a ligação às proteínas fica em torno de 55% (MAY, 2003; NELSON *et al.*, 1982).

O fenobarbital é extensivamente metabolizado no fígado, primariamente pelo CYP2C9 e em menor extensão pelo CYP2C19 e pelo CYP2E1, formando dois metabólitos majoritários: p-hidroxifenobarbital e o isômero 9-D-glucopiranosil fenobarbital. A meia vida plasmática do fenobarbital em adultos é de 70 a 140 horas, sendo o *clearance* interindividual extremamente variável. Este fármaco está sujeito à interação farmacocinética droga-droga, sendo isto uma consequência de sua potente ação indutora do metabolismo hepático, sendo que seu próprio metabolismo pode ser induzido ou inibido. Conseqüentemente existe uma larga diferença entre a dose administrada e a concentração plasmática alcançada em cada paciente (MAY, 2003; NELSON *et al.*, 1982). A faixa terapêutica aceita atualmente para o fenobarbital no plasma é de 10-40 mgmL<sup>-1</sup> (PATSALOS *et al.*, 2008).

### 3.3.2 Análise de Fenobarbital em Saliva

O uso da saliva como matriz alternativa para o monitoramento terapêutico do fenobarbital é de certa maneira controverso, uma vez que não existe nenhum consenso claro que a concentração salivar reflete diretamente a concentração plasmática da droga. Porém, estudos em adultos e crianças com epilepsia têm demonstrado que o fenobarbital se distribui na saliva com razão saliva/plasma na taxa de cerca de 0,52, com uma correlação de  $r^2 = 0,98$ . Assim, as concentrações salivares e plasmática de fenobarbital são significativamente correlacionadas e a



saliva pode ser utilizada como uma matriz alternativa bastante útil para o monitoramento terapêutico de fenobarbital (PATSALOS *et al.*, 2008).

### 3.4 FENITOÍNA

Em 1938, Murritt e Putnam introduziram a fenitoína no uso clínico, sendo considerado o início da era moderna da terapia anticonvulsivante. A fenitoína foi à primeira droga a conseguir controlar convulsões sem necessidade de sedação do paciente, sendo amplamente utilizada pelo mundo e bastante efetiva no controle de convulsões parciais e tônico-clônicas (MATTSON *et al.*, 1985; BAUMANN, 2007). Seu principal mecanismo de ação é o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, o que lhe confere grande eficácia principalmente contra crises epiléticas de início focal. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Apesar de toda sua efetividade e amplo uso, a absorção da fenitoína é bastante influenciada por alimentos o que faz com que o ajuste de dose ideal para cada paciente seja difícil, tornando o monitoramento terapêutico extremamente útil (CACEK, 1986; BAUMANN, 2007).

A fenitoína tem seu uso aprovado para monoterapias e co-terapias com outros anticonvulsivantes, e está disponível nas mais variadas formas farmacêuticas, como cápsulas, comprimidos mastigáveis, soluções orais e formulações parenterais (PATSALOS *et al.*, 2008).

#### 3.4.1 Características Farmacocinéticas

A taxa de absorção da fenitoína após a ingestão oral é variável e depende do tipo de formulação administrada, com um  $T_{\text{máx.}}$  de 1 a 12 horas (NEURVONEN, 1979). A biodisponibilidade também é dependente do tipo de formulação, porém gira em torno de 80%. Sua farmacocinética não é linear devido à saturação do metabolismo, o que resulta em uma cinética de Michaelis-Menten dentro do intervalo de concentrações séricas que são geralmente relacionadas com seu efeito terapêutico benéfico. A ligação dessa droga às proteínas é de cerca de 90% (RICHEMS, 1979).

A fenitoína é extensivamente metabolizada no fígado, primariamente pelo CYP2C9 e CYP2C19, para formar dois metabólitos principais: o 5-p-hidroxifenil-5-fenilhidantoína (que é submetido à conversão parcial para glucuronídeos antes da

excreção renal) e um derivado dihidroxindol (NAKAJIMA *et al.*, 2002). A eliminação sérica de meia vida da fenitoína em adultos é de 30 a 100 horas, sendo o *clearance* interindividual extremamente variável. A fenitoína está sujeita à várias interações farmacocinéticas droga-droga que são resultado do potente efeito indutor deste medicamento no metabolismo hepático. Este efeito pode ser tanto na aceleração quanto na inibição do metabolismo, conseqüentemente existe uma ampla diferença entre concentração administrada e concentração sérica que varia de paciente para paciente. O fato da fenitoína estar associada a uma farmacocinética não linear é uma das maiores razões para se tornar o monitoramento terapêutico uma prática comum na rotina clínica. A taxa plasmática aceita para a fenitoína atualmente é de 10 - 20 mg mL<sup>-1</sup>(PATSALOS *et al.*, 2008).

#### 3.4.2 Análise de Fenitoína em Saliva

Já foram realizados vários estudos a fim de investigar a distribuição da fenitoína na saliva e a relação existente entre a concentração deste medicamento na saliva e no plasma. A fenitoína se distribui na saliva de tal forma que sua concentração é bastante próxima à plasmática. A razão saliva/plasma é em torno de 0,99-1,06 e a correlação existente entre a concentração plasmática e salivar é de  $r^2 = 0,99$  (PATSALOS *et al.*, 2013). A concentração do medicamento na saliva pode aumentar ou diminuir de acordo com a coleta da saliva, sendo a condição de obtenção da saliva não estimulada a mais aconselhada para análise (KAMALI; THOMAS, 1994).

Assim, tem-se que a saliva pode ser utilizada como uma alternativa extremamente útil para o monitoramento terapêutico da fenitoína.

### 3.4 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO

#### 3.4.1 Monitoramento Terapêutico de Anticonvulsivantes

A quantificação de fármacos antiepilépticos em soro ou plasma para monitoramento terapêutico é hoje uma prática bem estabelecida no tratamento da epilepsia (PATSALOS *et al.*, 2008). O objetivo do monitoramento terapêutico nestes

casos é otimizar a clínica do paciente pelo gerenciamento da medicação com quantificação da concentração circulante do fármaco de acordo com o tempo de administração. A razão pela qual o monitoramento terapêutico emergiu como uma importante ferramenta no tratamento da epilepsia surgiu do fato de que otimizar a dose ideal de anticonvulsivante para cada paciente é bastante difícil. Isso se deve a vários fatores:

- O tratamento da epilepsia é profilático, e geralmente é difícil prever a dose que será necessária para controlar as crises convulsivas;
- Os sinais e sintomas clínicos da toxicidade por anticonvulsivantes nem sempre são rapidamente detectados;
- A correlação entre a concentração plasmática e efeitos clínicos é bem melhor que a de dose e efeito;
- Não existe um marcador clínico direto para demonstrar a eficácia ou toxicidade dos anticonvulsivantes (PATSALOS *et al.*, 2013).

Além disso, existe uma faixa terapêutica bastante ampla para a maioria dos anticonvulsivantes, uma vez que diferenças individuais na natureza e severidade da epilepsia resultam em uma efetividade e concentração de não toxicidade bastante variável de paciente para paciente. Assim, em alguns pacientes as convulsões podem ser bem controladas em concentrações plasmáticas abaixo do alvo e em outros as necessidades e tolerâncias em relação à concentração da droga vai exceder os limites (JOHANNESSEN *et al.*, 2003).

Muitos fatores estão relacionados com a imprevisibilidade e larga diferença interindividual na farmacocinética e distribuição dos anticonvulsivantes, o que torna impossível prever a dose ótima para cada paciente em particular, sendo o monitoramento terapêutico a forma mais efetiva para guiar o tratamento (HIEMKE *et al.*, 2011).

O metabolismo, ou biotransformação, dos anticonvulsivantes é o fator que mais pode influenciar na farmacocinética desses fármacos. Essas variações no metabolismo podem estar relacionadas a uma alteração no funcionamento de alguns órgãos, principalmente fígado e rins, fatores genéticos ou interações droga-droga ou droga-alimento (KRASOWSKI, 2010).

Muitos anticonvulsivantes são bem conhecidos como indutores enzimáticos, estimulando a metabolização de várias drogas no fígado e outros órgãos (SCHUETZ, 2001). Carbamazepina, fenobarbital e fenitoína são exemplos clássicos

desse tipo de interação, pois atuam nos receptores nucleares de hormônios como o receptor pregnana X, ou nos receptores constitutivos de androstana. Quando ativados pela ligação desses fármacos, esses receptores aumentam a expressão das enzimas do citocromo P450, enzimas de fase II e transportadores de efluxo. Isso tudo faz com que haja uma aceleração na eliminação dos anticonvulsivantes e outras drogas que sofram metabolização hepática (TIEN; NEGISHI, 2006; ZHANG; XIE; KRASOWSKI, 2008).

A insuficiência renal é outro fator que pode alterar a farmacocinética anticonvulsivante seja pela redução no *clearance* renal do fármaco e/ou seus metabólitos ou pela remoção da droga durante a diálise (LACERDA *et al.*, 2006).

Algumas drogas também podem inibir o metabolismo dos anticonvulsivantes, geralmente pelo bloqueio das enzimas do complexo P450, levando a concentrações excessivas da droga. Como exemplo, desta interferência, temos o ácido valpróico, que conhecidamente atua como um inibidor de múltiplas enzimas hepáticas e causa interação droga-droga com outros anticonvulsivantes (NEELS *et al.*, 2004).

Variações na farmacocinética também podem ser observadas em situações de alterações na absorção e distribuição dos anticonvulsivantes (KRASOWSKI, 2010).

Vários fluídos biológicos, como plasma e saliva, podem ser utilizados para monitorar a concentração plasmática de uma ampla variedade de anticonvulsivantes, sendo estes dados extremamente úteis para determinar a terapia ideal para cada paciente (DROBITCH; SVENSSON, 1992).

### 3.5 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DA SALIVA

Os recentes avanços tecnológicos tornaram possível a detecção e quantificação de substâncias químicas, hormônios, drogas e agentes infecciosos na saliva ou fluido oral. O termo fluido oral é preferido para amostras recolhidas a partir da boca, pois engloba além da saliva, resíduos de alimentos e de outros materiais presentes (CHOO; HUESTIS, 2004).

A saliva é produzida por três glândulas salivares pareadas (FIGURA 2) e o fluido aquoso produzido contém a amilase, uma enzima bastante importante na quebra do amido. A composição do fluído varia de acordo com a idade, sexo, dieta e

ritmo circadiano. A taxa de secreção também é influenciada por vários fatores, como estimulação simpática ou parassimpática (BAUMANN, 2007). A composição da saliva é bem próxima a do fluido extracelular, com a adição de pequenas quantidades de proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e lipídios quando comparado com o plasma. O pH da saliva varia entre 6,2 e 7,4, sendo que tem uma importante correlação com as taxas de fluxo de produção: pH mais elevado está relacionado a uma taxa de fluxo mais elevada (DROBITCH; SVENSSON, 1992).

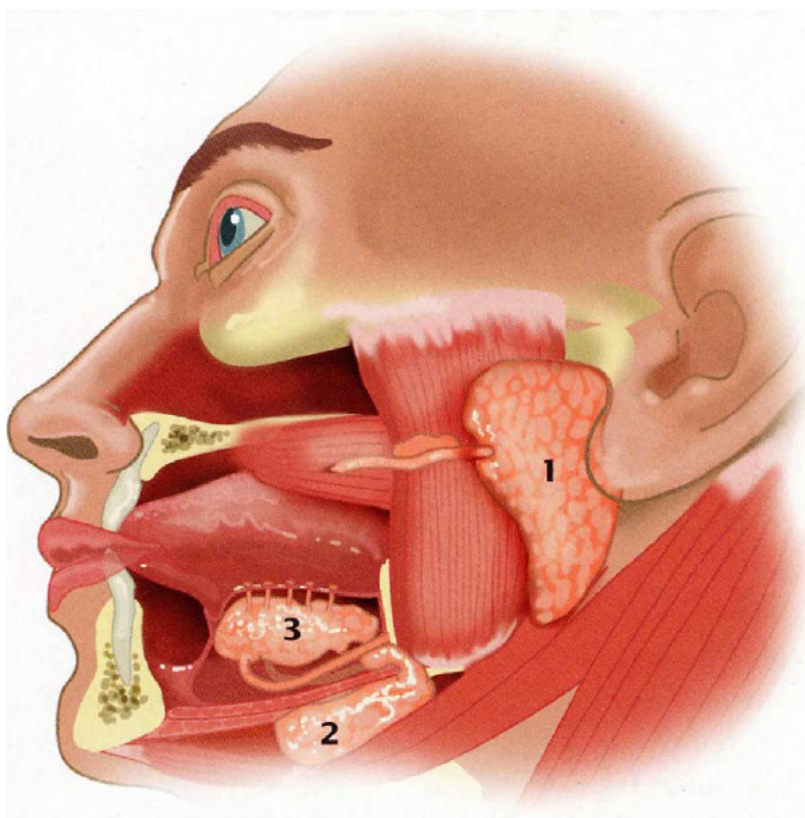


FIGURA 2: A POSIÇÃO ANATÔMICA DE DAS TRÊS GLÂNDULAS SALIVARES MAIS IMPORTANTES: A GLÂNDULA PARÓTIDA (1), A GLÂNDULA SUBMANDIBULAR (2) E A GLÂNDULA SUBLINGUAL (3).

O fluido oral contém vários dos analitos presentes no plasma, sendo que em muitos casos reflete de maneira direta a fração livre de fármacos presentes na circulação. O teste de fluido oral pode ser utilizado para o diagnóstico de doenças, para o monitoramento terapêutico e para a detecção do uso de drogas ilícitas. Este tipo de teste pode também ser benéfico para a determinação das concentrações de compostos endógenos que sinalizam um funcionamento fisiológico anormal. Por estas razões há grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos

capazes de detectar substâncias ativas nesse tipo de matriz (CHOO; HUESTIS, 2004).

Difusão passiva é o mecanismo mais comum de transferência da substância ativa para a saliva. Essa difusão só pode ser feita por moléculas não ionizadas e com um peso molecular menor que 500 Da. Outro fator que influencia essa passagem é o pH do fluído oral e do plasma e o pKa, peso molecular, configuração espacial e lipossolubilidade do analito. O pKa da droga e a diferença de pH entre plasma e saliva vão determinar o quanto de fármaco chegará ao fluído oral. Como o pH da saliva geralmente é menor que o do plasma, substâncias de caráter básico têm uma facilidade maior de serem encontradas na saliva (CHOO; HUESTIS, 2004). Porém, isso não é uma verdade universal, pois em um estudo realizado com a carbamazepina não foi encontrada uma correlação entre pH e concentração do fármaco. Também considera-se que um aumento na taxa de produção salivar pode resultar na diluição e consequente redução na concentração da droga (GORODISCHER; KOREN, 1992).

O monitoramento terapêutico de diversas drogas em saliva geralmente tem se apresentado mais amigável ao paciente e barato em relação ao uso de outros fluídos biológicos. A coleta da amostra é rápida, não-invasiva, menos desagradável para os pacientes, e mais fácil em crianças e aqueles com acesso venoso dificultado (CHOO; HUESTIS, 2004). A dor, o medo de agulhas e as potenciais complicações associadas com as punções sanguíneas como sangramento, infecção e descoloração da pele são evitadas no monitoramento terapêutico realizado através da saliva. Além disso, para obter amostras de sangue são necessários serviços de técnicos especializados em coleta sanguínea, que pode onerar bastante este tipo de análise (GORODISCHER *et al.*, 2004). E não só no sentido de custos com salário, mas também custos com tempo e transporte do paciente até o hospital ou laboratório para realização das coletas. O fator transporte é bastante importante, especialmente quando se trata de pessoas com epilepsia, uma vez que diversos adultos com essa doença não podem dirigir e tem limitado acesso a hospitais e laboratórios (BAUMANN, 2007).

A questão da aceitabilidade da saliva no monitoramento terapêutico tem sido examinada de diversas maneiras, sendo que vários estudos já foram realizados e bem aceitos pela comunidade científica (TENNISON *et al.*, 2004).

A coleta de saliva não exige nenhum tratamento especial e, presumivelmente, pode ser obtida da maioria dos pacientes em suas próprias casas (TENNISON *et al.*, 2004). Os anticonvulsivantes e seus metabólitos são relativamente estáveis ao ambiente salivar (ROSENTHAL *et al.*, 1995). Geralmente a saliva é congelada após a coleta, sendo que estudos demonstram que a maioria dos anticonvulsivantes é estável a esse congelamento e até mesmo ao aquecimento (RYAN *et al.*, 2004; BAUMANN, 2007).

### 3.5.1 Composição Salivar

A saliva é uma secreção exócrina mucoserosa clara e levemente ácida, sendo resultado de uma mistura de fluídos provindos das glândulas salivares maiores e menores e do fluído crevicular gengival, que contém as bactérias orais e restos de alimentos (EDGAR, 1992; ROTH; CALMES, 1981).

A saliva é composta por uma variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos. Também são encontradas na saliva imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados, como uréia e amônia. Estes componentes interagem entre si para garantir funções específicas:

- Bicarbonatos, fosfatos e uréia: atuam na modulação do pH e capacidade tamponante da saliva;
- Macromoléculas, proteínas e mucinas: atuam na limpeza, agregação ou captura de micro-organismos e contribuem para o metabolismo da placa dental;
- Cálcio, fosfato e proteínas: atuam juntamente como um agente antisolubilizante e modulam a desmineralização e remineralização;
- Imunoglobulinas, proteínas e enzimas: promovem ação antibacteriana (HUMPHREY *et al.*, 2001).

A produção diária de saliva em indivíduos saudáveis é de um litro a um litro e meio, contribuindo tanto para a saúde oral quanto sistêmica dos indivíduos (EDGAR, 1990).

### 3.5.2 Coleta de Saliva

A coleta de saliva é bastante simples, porém é necessário que os pacientes estejam cientes do protocolo de coleta. Devem ser estabelecidos tempos corretos para coleta da saliva, para evitar que o paciente tenha escovado os dentes e evitar ingestão de comidas e bebidas (com exceção de água) ao menos 30 minutos antes da coleta e enxaguar a boca com água destilada. A padronização da coleta da saliva tem uma grande importância neste tipo de análise, uma vez que diversos fatores podem afetar o fluxo e composição salivar (CHIAPPIN *et al.*, 2007).

A coleta da saliva é fácil e não exige a presença de profissional especializado e pode ser feito pelo próprio paciente (FIGURA 3). A saliva não estimulada pode ser coletada com diversos dispositivos coletores de fluidos orais, sendo que os mais simples são:

- Baba passiva (sem movimentos orais): permitir que a saliva escorra do lábio inferior para um frasco plástico (NURKKA *et al.*, 2003);
- Cuspir diretamente em um frasco coletor: este tipo de coleta apresenta até 14 vezes mais bactérias que a coleta passiva, o que influencia no armazenamento e posterior análise dos componentes (NURKKA *et al.*, 2003).

A saliva estimulada pode ser obtida através de movimentos orais, como uma gentil mastigação, ou através do uso de ácido cítrico (SCHWARTZ *et al.*, 1998).

Existem também dispositivos comerciais para a coleta de saliva, sendo a maioria composta por algodão estéril. O mais comum deles é o Salivette®, que é composto por um rolo de algodão que é colocado na boca do paciente por um ou dois minutos e então colocado dentro de um pequeno frasco plástico. Posteriormente este frasco é centrifugado liberando a saliva para análise (MYLONAS *et al.*, 2006).





FIGURA 3: MÉTODOS DE COLETA DE SALIVA. COLETA PASSIVA (LADO ESQUERDO) E COLETA POR SALIVETTE (LADO DIREITO).

### 3.6 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO POR CLAE-EM/EM

Originalmente, o monitoramento terapêutico era necessário apenas para um pequeno número de fármacos, porém atualmente vem ganhando bastante destaque no meio médico, como estratégia para ajuste de dose de diversos medicamentos com estreita margem terapêutica.

Melhorias no tratamento de pacientes baseados na avaliação da concentração de drogas no sangue de cada paciente têm ganhado cada vez mais destaque e, é necessário que o método analítico utilizado para esta quantificação ofereça precisão, especificidade, seletividade e reprodutibilidade.

Atualmente, a técnica mais utilizada para monitoramento terapêutico de imunossupressores, antibióticos e anticonvulsivantes é o imunoensaio. No entanto, essa técnica é pouco específica para certas drogas e sujeita a muitos interferentes. Além disso, o custo dos reagentes e consumíveis é alto (MARQUET *et al.*, 2007).

A cromatografia a líquido acoplada a detectores específicos, como o detector de arranjo de diodos (DAD) tem se apresentado com uma interessante alternativa as técnicas de imunoensaios para o monitoramento terapêutico. Porém a limitada especificidade do espectro de ultravioleta, sua variabilidade em função do pH e o fato de vários compostos apresentarem uma baixa absorção, faz deste tipo de análise confiável, mas não tão versátil (MARQUET *et al.*, 2007).

Inicialmente a técnica de monitoramento terapêutico por CLAE-EM/EM era usada basicamente em pesquisa, uma vez que necessitava de um elevado investimento e existiam empecilhos técnicos na adoção destes procedimentos na rotina laboratorial. Desde então, a técnica tem crescido de maneira vertiginosa e utilizada em um crescente número de aplicações, o que tem resultado em uma

significante redução nos custos e tornou a sua aplicação mais simples. Obviamente, a pergunta para responsáveis por laboratórios clínicos hoje, não é mais se há recursos disponíveis para investir em um sistema de CLAE-EM/EM, mas sim que métodos devem ser transferidos de imunoensaios clássicos ou outras técnicas cromatográficas para a CLAE-EM/EM, e quais novos procedimentos e métodos de quantificação deverão ser desenvolvidos utilizando esta tecnologia (MARQUET *et al.*, 2007).

### 3.6.1 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas utilizando recursos de Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM)

A espectrometria de massas é uma técnica poderosa para auxiliar na identificação de compostos desconhecidos, estudar estruturas moleculares e quantificação de compostos em baixas concentrações. Sua aplicação vai desde quantificação e identificação de pesticidas em amostras de água até determinação do ângulo de colisão em mecanismos de reações (VAN BRAMER, 1997).

A espectrometria de massas pode ser definida como uma técnica para “pesar” moléculas. Porém não funciona como uma balança convencional. Esta “pesagem” é realizada através do movimento de partículas carregadas, chamadas de íons, em um campo elétrico ou magnético. A razão carga massa ( $m/z$ ) do íon que irá determinar este movimento (VAN BRAMER, 1997).

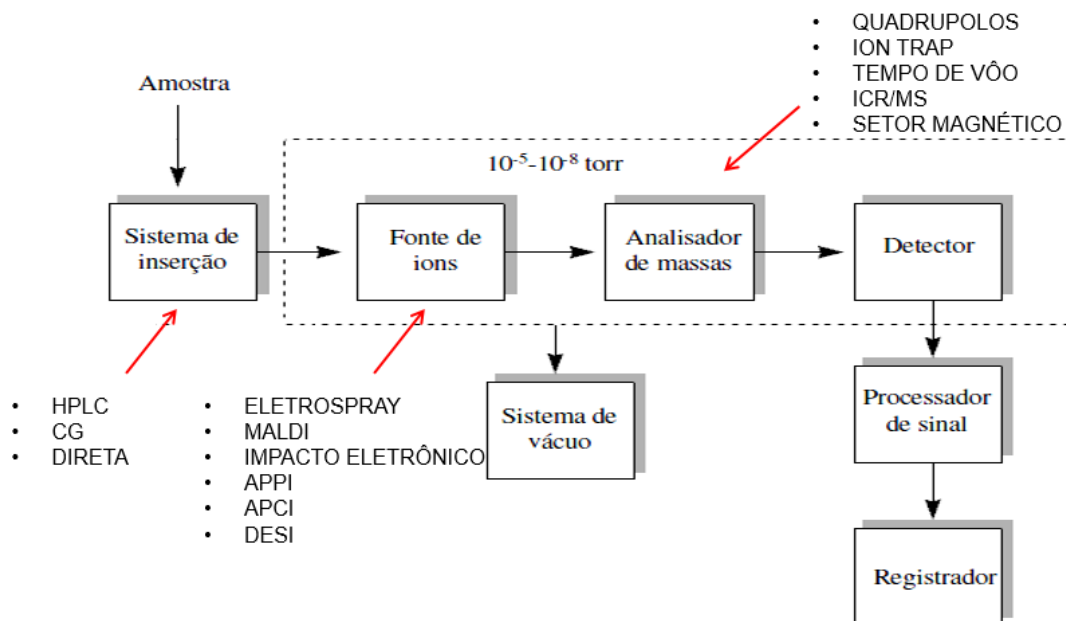


FIGURA 4: DIAGRAMA DE BLOCOS DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (VAN BRAMER, 1997).

A figura 4 é um diagrama de blocos que demonstra as partes básicas de um espectrômetro de massas. O *inlet* ou sistema de inserção é a parte responsável por introduzir a amostra dentro do espectrômetro de massas. Já a fonte de ionização é responsável por ionizar as moléculas neutras da amostra. O analisador de massas, por sua vez, é considerado o coração do espectrômetro de massas. Esta parte é responsável por separar os íons, seja em espaço ou tempo, de acordo com sua razão massa carga ( $m/z$ ). Depois de separados, eles são detectados e o sinal transferido para o sistema de dados para posterior análise. Todos os espectrômetros de massas apresentam também um sistema de vácuo que mantém a baixa pressão, também chamada de alto vácuo, requerido para o funcionamento do sistema. Este alto vácuo minimiza as reações íon-molécula, dispersões e neutralização dos íons (VAN BRAMER, 1997).

Muitas técnicas de ionização são utilizadas na espectrometria de massas. A maioria das técnicas de ionização excita a molécula neutra do analito que então ejeta um elétron para formar um cátion radical ( $M^+$ ). Outras técnicas envolvem a reação íon molécula que produz íons adutos ( $MH^+$ ). O mais importante para a definição da melhor técnica de ionização é o estado físico do analito e a energia de ionização. A ionização por impacto eletrônico e a ionização química são mais compatíveis com ionização em fase gasosa, enquanto que a ionização por

*electrospray* (ESI) e a por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) são as mais utilizadas para ionização de amostras em fase condensada. A energia de ionização é bastante importante porque vai determinar o perfil de fragmentação observado pelo espectrômetro de massas. Este perfil de fragmentação, por sua vez, será útil para fornecer informações estruturais das moléculas. Algumas ionizações são consideradas brandas e produzem apenas íons moleculares, enquanto outras técnicas são bastante intensas e provocam extensiva fragmentação da molécula (VAN BRAMER, 1997).

Tais como as fontes de ionização, diversos também são os tipos de analisadores os quais tem a finalidade de separar os íons de acordo com a sua razão massa carga ( $m/z$ ) e transmiti-los até o detector. A escolha do melhor tipo de analisador depende da resolução desejada, do intervalo de massas a ser analisado e do limite de detecção para cada aplicação (VAN BRAMER, 1997).

No caso específico deste trabalho utilizamos um equipamento de Cromatografia a Líquido acoplado a um Espectrômetro de Massas do tipo Triplo Quadrupolo com recursos de Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM).

Neste equipamento, a introdução da amostra se dá através da cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). O princípio de separação desta técnica é baseado nas características físico-químicas de cada composto e uma ou mais interações entre o soluto e a fase estacionária, o que resulta numa migração pela coluna de forma seletiva. Essas interações podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de *Van der Waals*, aos quais de acordo com sua natureza, classificam os modos de separação em cromatografia em fase reversa, cromatografia em fase normal, cromatografia de troca iônica e cromatografia por exclusão. Foi utilizada para o desenvolvimento do trabalho a cromatografia em fase reversa, que é a mais utilizada na rotina analítica e consiste em uma fase estacionária de baixa polaridade e uma fase móvel de maior polaridade (TONHI *et al.*, 2002). Nos últimos anos esta técnica tem ganhado bastante destaque e vem sendo amplamente utilizada na rotina analítica. Este tipo de sistema de introdução de amostra é usado principalmente para moléculas termicamente instáveis, pois não envolve o uso de altas temperaturas para separação dos analitos como na cromatografia a gás.

A fonte de ionização utilizada foi a *electrospray* (ESI). Neste tipo de fonte o processo de ionização é brando, que mantém na maioria das vezes intacta a

molécula precursora com uma ou múltiplas cargas carregadas positivamente ou negativamente. Além disto, este sistema trabalha muito bem com mistura de solventes aquosos e orgânicos sendo, portanto, o mais apropriado para a hifenação com o cromatógrafo a líquido em análises quantitativas analíticas e bioanalíticas. Outra grande vantagem desta fonte de ionização está na ampla faixa de tamanho das moléculas que podem ser ionizadas, o que possibilita o estudo de proteínas e de complexos multimoleculares. Adicionalmente, a ESI produz íon de maneira rápida e, sensível, podendo ser utilizada para investigar compostos em matrizes complexas com alta sensibilidade e ainda, com a possibilidade de análise de compostos termicamente sensíveis, o que justifica seu amplo uso (VAN BRAMER, 1997; DOOLEY, 2003; GLISH; VACHET, 2003; NIESSEN, 2003). Como qualquer fonte de ionização, ESI também possui deficiências como a necessidade de fluxo constante da amostra (o que ocasiona maior gasto de solventes), além do efeito de supressão iônica em matrizes que contenham concentrações elevadas de sal (GLISH; VACHET, 2003).

Na essência, o processo de ionização por ESI envolve a produção de um fino spray que ioniza as gotas que são liberadas no capilar, que carrega o líquido de eluição, geralmente provindo do sistema de CL ou da infusão direta da solução da amostra. Isto é alcançado pela aplicação de uma alta voltagem (geralmente 3-5 kV) na saída do capilar, que cria um alto potencial elétrico e causa a produção de uma nuvem de gotas carregadas. Quando isso ocorre na pressão atmosférica o termo Ionização por Pressão atmosférica (API) é utilizado. Este processo de nebulização pode necessitar do auxílio de um gás, usualmente nitrogênio. O nitrogênio também é necessário como um complemento para a evaporação do solvente das gotas, que se tornam cada vez menores, aumentando a densidade de carga até o ponto em que a instabilidade é tanta que provoca a quebra das gotículas em gotas ainda menores. Este processo continua até que se formem íons de-solvatados, que passam para a região de alto vácuo do analisador de massas através de uma pequena abertura, sendo guiadas por diferença de potencial.

Uma outra fonte de ionização é a Ionização Química a Pressão Atmosférica, chamada de APCI. Esse tipo de ionização produz íons pela ação da descarga corona em pressão atmosférica, sendo basicamente aplicada em compostos menos polares do que os analisados pela ESI, geralmente produzindo íons monovalentes a partir de um gás nebulizador que evapora o solvente por ação de altas temperaturas.

Esta forma de ionização é menos susceptível que o ESI a supressão iônica, porém não é indicada para compostos termolábeis. (CHANG-KEE; GWYN, 2002).

Já o analisador de massas escolhido foi o triploquadrupolo, que é o mais indicado para análises de quantificação, e também apresenta fundamental importância na identificação de compostos (VAN BRAMER, 1997; KORFMACHER, 2005; CATALDI;BIANCO;ABATE, 2008). Os analisadores tipo triploquadrupolo são relativamente baratos, compactos, rápidos e de alta eficiência de transmissão e consistem basicamente em quatro barras cilíndricas dispostas simetricamente umas das outras. Dentro do espectrômetro de massas, um campo elétrico acelera os íons para fora da fonte de ionização e para dentro dos quadrupolos. A transmissão se dá através de uma rádio frequência (RF) e uma corrente de voltagem (DC) aplicada aos eletrodos a qual oscila o campo elétrico funcionando como um filtro, transmitindo até o detector somente a relação  $m/z$  selecionada (VAN BRAMER, 1997). O analisador do tipo triplo quadrupolo possui dois sistemas seletivos de filtros de massas os quais são dispostos em série sequenciais. Íons precursores de massa/carga específicos são selecionados em um primeiro filtro de massas sendo direcionados para uma câmara ou cela de colisão, onde colidem com um gás inerte formando íons fragmentos (FIGURA5). Isto aumenta significativamente a especificidade da detecção de uma determinada molécula, pois os fragmentos dos íons formados são característicos para cada composto, o que permite definir adicionalmente, a classe de cada molécula precursora, uma vez que os íons fragmentos são característicos de cada composto (DOOLEY, 2003). Após a passagem dos íons pelo analisador estes são transmitidos até o detector, gerando um sinal através da formação de elétrons secundários que são amplificados, ou induzindo uma corrente gerada por uma carga móvel. Vários tipos de detectores para espectrômetros de massas estão disponíveis no mercado sendo o mais comum o multiplicador de elétrons. Os critérios mais importantes que distinguem diferentes tipos de detecção de íons são a sensibilidade, a precisão e o tempo de resposta. Um multiplicador de elétrons, por exemplo, apresenta resposta rápida em sistemas acoplados a cromatografia, permitindo varreduras de massas de 50-500 Da em 0,1 segundo (SIUZDAK *et al.*, 1996).

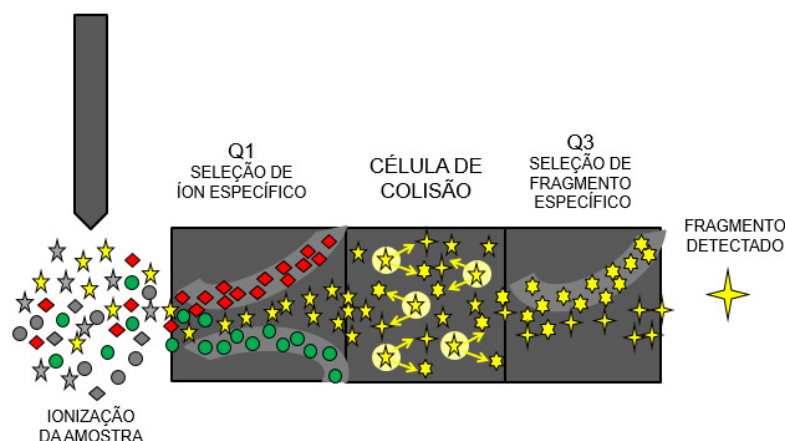


FIGURA 5: ESQUEMA DE UM EXPERIMENTO DE MRM EM UM ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TRIPLOQUADRUPOLO.

### 3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Uma vez que o método bioanalítico é desenvolvido, vários testes são conduzidos para provar que um método pode ser utilizado para a aplicação pretendida. Esse conjunto de testes é chamado de validação do método. Além da comprovação da precisão, exatidão e estabilidade do método por CLAE-EM/EM, uma investigação de efeitos da matriz deve ser realizada. A recuperação da extração do analito e potencial *carryover* também devem ser cuidadosamente avaliados. A indústria farmacêutica e agências regulatórias geralmente reconhecem e aceitam que a validação de um método seja realizada utilizando padrões e amostras de controle de qualidade nas quais a matriz biológica “branco” é fortificada com o analito (ZHOUA *et al.*, 2005).

No Brasil a resolução RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 regulamenta os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, sendo prioritários os ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade.

#### 3.7.1 Especificidade

Especificidade pode ser definida como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes.

Essa etapa é composta pela avaliação de amostras branco, consideradas isentas dos analito de interesse, a fim de avaliar a presença de picos interferentes da própria amostra, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz no tempo de retenção característico ao analito de interesse e de seu padrão interno (PI).

Para sua realização são analisadas no mínimo 6 (seis) amostras de plasma de fontes distintas, sendo 4 (quatro) plasmas normais, 1 (um) hemolisado e 1 (um) lipêmico. Quando a amostra a ser analisada é diferente do plasma, como a saliva, deverão ser analisadas 6 amostras de fontes distintas. Como critério de aceitação, tem-se que as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do limite inferior de quantificação do método (LIQ). Já as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI. Caso uma ou mais amostras analisadas apresentem interferência acima dos limites estabelecidos, novas amostras deverão ser testadas, no mínimo utilizando outras seis fontes distintas (BRASIL, 2012).

### 3.7.2 Efeito residual

O efeito residual também conhecido como *carryover* é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. De acordo com a RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012, devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra considerada branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ. Para a comprovação da ausência do efeito residual, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. Enquanto as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI (BRASIL, 2012).

Caso o efeito residual seja inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas (BRASIL, 2012).



### 3.7.3 Efeito matriz

A RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 define efeito matriz como o efeito dos componentes da matriz biológica na resposta do analito ou PI (BRASIL, 2012). Este ensaio veio substituir o conhecido teste de recuperação que apresentava algumas limitações. Agora o objetivo principal não está apenas em ter a melhor eficiência de extração do analito e sim extrair a menor quantidade de interferentes da matriz. Muitas vezes, o que era apresentado como um excelente sinal analítico estava mascarado por componentes da matriz. Através deste ensaio garante-se que, mesmo não obtendo a melhor recuperação, não há nenhum componente da matriz influenciando a análise.

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas (brancos), posteriormente adicionadas de concentrações definidas de analitos e PI, e analitos em soluções, nas mesmas concentrações. Deverão ser avaliados 8 CQB e 8 CQA, sendo: 4 plasmas normais, 2 plasmas lipêmicos e 2 plasmas hemolisados para cada concentração. No caso de saliva, deverão ser testadas 6 amostras de fonte distintas em cada concentração. Essas amostras serão comparadas com as respectivas soluções, utilizando o Fator Matriz Normalizada por PI (FMN), calculado segundo a seguinte fórmula:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

O Coeficiente de variação entre todos os FMN não pode ser superior a 15% (BRASIL, 2012).

### 3.7.4 Linearidade

A curva de calibração é definida como a relação entre a resposta do instrumento frente a concentrações conhecidas do analito (BRASIL, 2012). A validação, quanto a este parâmetro, deve garantir um máximo de precisão, exatidão e confiança nos resultados, permitindo a visualização de quais os valores de concentração se encontram deslocados em um intervalo não linear de resposta.

Uma curva de calibração deve ser gerada para cada analito e corrida analítica, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Cada curva deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de cada controle de qualidade (CQs) contendo o padrão interno e o padrão do analito em concentrações pré-estabelecidas: controle de qualidade do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e o controle de qualidade de diluição (CQD) (BRASIL, 2012).

A curva de calibração deve contemplar no mínimo em 6 (seis) níveis distintos de concentração, sendo que quaisquer procedimentos alternativos devem ser justificados. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados sendo recomendável o modelo matemático mais simples, geralmente o linear. Caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva (BRASIL, 2012).

Os critérios de aceitação da curva de calibração são:

- Desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ;
- No mínimo 75% dos padrões da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- No mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo LIQ e LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores (BRASIL, 2012).

Recomenda-se que o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) seja igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

### 3.7.5 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogenea, sob condições idênticas de ensaio (ICH, 2005). Pode ser definido como proximidade dos resultados obtidos por repetidas determinações de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012). Este parâmetro é avaliado utilizando-se, pelo menos, 5 (cinco) níveis de concentrações (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) que contemplem a faixa de variação do procedimento analítico, sendo necessário no mínimo, 5 (cinco) replicatas para cada nível de concentração. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas em dias diferentes (precisão intercorridas) (BRASIL, 2012).

A precisão pode ser expressa em termos da característica da dispersão dos resultados, ou seja, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (BRASIL, 2003; USP, 2007; BRASIL, 2012). Como valores de referência não se admitem variações superiores a 15%, exceto para o LIQ, onde se admite valores menores ou iguais a 20%, calculados conforme a fórmula a seguir:

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CME}$$

Em que o DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CME, a concentração média experimental (BRASIL, 2012).

### 3.7.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro ou de referência em relação ao valor encontrado experimentalmente. Este parâmetro é determinado em pelo menos 5 (cinco) níveis de concentração (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em cinco replicatas cada. Deve ser avaliado em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída), e também em, no mínimo, três corridas analíticas em dias diferentes (exatidão intercorridas).

A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não

se admitem valores fora da faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR (\%)} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

### 3.7.7 Estudo de Estabilidade

Um dos principais problemas relativos às amostras biológicas é a instabilidade das drogas, seus metabólitos ou ainda das pró-drogas. Por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Os problemas de estabilidade podem ocorrer em qualquer etapa de um procedimento analítico (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009), mas em geral se relacionam com as condições de armazenamento, presença de enzimas, pH, anticoagulante, ciclos de descongelamento, luz, pelas propriedades químicas da droga, da matriz e do recipiente de armazenamento (FDA, 2001; BRASIL, 2003; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Portanto, um estudo de estabilidade não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (FDA, 2001; BRASIL, 2003; 2012).

O teste deve reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras e sendo assim a substância de interesse deve ser avaliada durante armazenagens de curta e longa duração, após ciclos de congelamento e descongelamento, e também nas condições normais de análise (BRASIL, 2003; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; BRASIL, 2012). Os resultados devem expressar um comparativo entre amostras com diferentes períodos de armazenagem, e amostras fortificadas com soluções estoque recém-preparadas, nas mesmas concentrações.

São consideradas amostras estáveis quando não forem observadas concentrações com desvios superiores a 15% quando comparadas a amostras recém preparadas. (FDA, 2001; BRASIL, 2003; 2012).

Além da estabilidade do analito em matriz biológica, deve ser demonstrada a estabilidade do analito e do padrão interno em solução. Para isso, no mínimo, 3 (três) amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho

de menor concentração devem ser armazenadas por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas. As soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas (BRASIL, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES

Metanol e acetonitrila (ambos grau CLAE) foram adquiridos da marca Tedia (Fairfield, EUA). O formiato de amônio (99%) da AcrosOrganics (Nova Jersey, EUA). A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q®(Millipore, Bedford, EUA). Os padrões analíticos de topiramato (99,6%) e fenobarbital (99,9%) utilizados foram adquiridos da USP enquanto os padrões de fenitoína (99,8) e prednisona (99,9) são Substâncias Químicas de Referência (SQRs) padronizadas pela Farmacopéia Brasileira.

### 4.2 OBTENÇÃO DE PLASMA E SALIVA

Os plasmas branco, hemolisado e lipêmico utilizados no desenvolvimento e validação do método foram gentilmente cedidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar, Curitiba, Brasil).

A saliva branca foi doada por voluntários do projeto. A coleta foi realizada em pequenos copos plásticos, nos quais os voluntários expectoram aproximadamente 0,250 mL de saliva. Os voluntários não ingeriram nenhuma comida ou líquido nos 20 minutos antecedentes a coleta, apenas um copo de água de 250 mL cerca de 10 minutos antes da coleta. Devida a alta viscosidade da saliva, as alíquotas foram, então centrifugadas por 15 minutos, a 14000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha) e somente o sobrenadante utilizado nas análises (ZA'ABI, 2003).

Todas as amostras, tanto de plasma como de saliva, foram mantidas em freezer a -40 °C.

### 4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque de fenobarbital, fenitoína, topiramato e prednisona (padrão interno) foram preparadas, separadamente, em metanol de modo a obter uma concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>. A partir das soluções estoque, soluções de trabalho foram preparadas de acordo com a concentração necessária para cada

experimento através de diluição apropriada com misturas de acetonitrila e água. Todas as soluções foram mantidas em freezer a - 40 °C.

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTROMETRO DE MASSAS

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canada), equipado com uma bomba seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, EUA) e uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas no modo positivo e negativo de ionização. Para realização deste experimento, soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações utilizando como diluente uma mistura de acetonitrila:água, variando a proporção e concentração do aditivo formiato de amônio para alcançar a melhor condição de ionização do analito. Cada solução foi infundida sob fluxo de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  em bomba seringa, utilizando a fonte de ionização ESI, operando no modo positivo e negativo de ionização. A posição do capilar foi mantida em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

Em seguida foi realizado o experimento de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Para este ensaio a concentração dos analitos foi variada a fim de obter uma intensidade de sinal entre  $2 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  cps no experimento de *Múltiplo Íons*. Foram otimizados automaticamente os parâmetros de potencial de declusterização (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na célula de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula (CXP), para obtenção de dois íons fragmentos de maior intensidade para a fenitoína, fenobarbital, topiramato e prednisona, separadamente.

A próxima etapa foi a realização da análise por injeção em fluxo (FIA). Essa etapa consistiu no acoplamento do cromatógrafo líquido ao espectrômetro de massas para otimização dos seguintes parâmetros: cortina de gás (CUR), dissociação ativada por colisão (CAD), gás nebulizador (GS1), gás turbo (GS2), voltagem do spray de ionização (IS) e temperatura da fonte (TEM). As análises foram realizadas sem coluna utilizando como fase móvel uma mistura de

acetonitrila:água (50:50 v/v). O fluxo foi mantido em 200  $\mu\text{L min}^{-1}$  e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ .

#### 4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por CLAE foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de uma bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, EUA), que durante as análises foi mantido a 4 °C. Acetonitrila e metanol foram utilizados como solvente de limpeza. O nitrogênio utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram tratados através do software Analyst 1.4 (ABI/Sciex). Para escolha da fase móvel foram analisadas acetonitrila e solução tampão de formiato de amônio em diferentes proporções. A fase móvel foi eluída em modo isocrático e gradiente. Várias condições foram avaliadas para otimização da separação. Foi testado tampão formiato de amônio nas concentrações de 1 mM e 5 mM com diferentes ajustes de pH. A coluna disponibilizada para este estudo foi a X-Bridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm), 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna XBridge RP18 (10 x 2,1 mm), 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula (Waters Corporation, Milford, EUA).

#### 4.6 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA E SALIVA BRANCOS FORTIFICADOS

Foram avaliados dois procedimentos de extração para melhor recuperação dos analitos: a precipitação de proteínas com coleta do sobrenadante e a precipitação de proteínas seguida por secagem do sobrenadante e ressuspensão.

*Precipitação de proteínas com coleta do sobrenadante:* Para a condução dos ensaios, alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de plasma branco ou saliva (livres dos analitos) foram inicialmente transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Em seguida, as amostras foram fortificadas com 25  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno (PI) em acetonitrila e 25  $\mu\text{L}$  de uma mistura de padrões contendo fenitoína, fenobarbital e



topiramato também em acetonitrila, de modo a obter as concentrações de 300 ng mL<sup>-1</sup> de PI e 200 ng mL<sup>-1</sup>, 400 ng mL<sup>-1</sup> e 80 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente dos analitos. Uma alíquota de 1,45 mL de solução de acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio a 1,0 mM foi adicionada a um tubo plástico contendo a amostra fortificada. A amostra foi agitada em vórtex por 60 segundos e, em seguida, submetida à centrifugação por 10 minutos, a 9000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um *vial* e posteriormente injetado no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.

*Precipitação de proteínas seguida por concentração por secagem e ressuspensão:* Para a condução dos ensaios, alíquotas de 100 µL de plasma branco (plasma livre dos analitos) foram inicialmente transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Em seguida, as amostras foram fortificadas com 25 µL de solução de padrão interno em acetonitrila e 25 µL de uma mistura de padrões contendo fenitoína, fenobarbital e topiramato também em acetonitrila, de modo a obter as concentrações de 300 ng mL<sup>-1</sup> de PI e 200 ng mL<sup>-1</sup>, 400 ng mL<sup>-1</sup> e 80 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente dos analitos. Uma alíquota de 0,95 mL de acetonitrila foi adicionada ao tubo plástico contendo a amostra fortificada. A amostra foi agitada em vórtex por 3 minutos e, em seguida, submetida à centrifugação por 10 minutos, a 9000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha). Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico, e levado a um concentrador de amostras para evaporação (CentriVapLabconco, Kansas City, EUA). O resíduo remanescente foi ressuspensionado em 500 µL de solução de acetonitrila e água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio a 1,0 mM mediante agitação em vórtex por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um *vial* e posteriormente injetado no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.

#### 4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Tendo estabelecido as condições de extração dos analitos e do PI das matrizes saliva e plasma, partiu-se para o preparo das amostras para o desenvolvimento e validação do método analítico. Para isso as amostras de plasma e saliva foram preparadas como segue:

Uma aliquota de 30  $\mu\text{L}$  de plasma ou saliva branco, descongelados a temperatura ambiente, foi fortificada com solução de trabalho diluídas em acetonitrila contendo fenitoína, fenobarbital e topiramato (25  $\mu\text{L}$ ), nas concentrações adequadas a obter os níveis da curva de calibração (Tabela 1) e dos controles (Tabela 2). Adicionalmente, 25  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho diluída em acetonitrila de prednisona (PI) foram adicionados de modo a obter uma concentração final de 300  $\text{ng mL}^{-1}$  para as amostras de plasma e de 600  $\text{ng mL}^{-1}$  para saliva.

TABELA 1: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS EM PLASMA E EM SALIVA.

Nível	Analito	Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ )
1 (LIQ)	Fenitoína	5,0
	Fenobarbital	50,0
	Topiramato	2,5
2	Fenitoína	10,0
	Fenobarbital	100,0
	Topiramato	5,0
3	Fenitoína	50,0
	Fenobarbital	500,0
	Topiramato	30,0
4	Fenitoína	150,0
	Fenobarbital	900,0
	Topiramato	80,0
5	Fenitoína	250,0
	Fenobarbital	1300,0
	Topiramato	130,0
6	Fenitoína	350,0
	Fenobarbital	1700,0
	Topiramato	180,0
7 (LSQ)	Fenitoína	450,0
	Fenobarbital	2000,0
	Topiramato	250,0

TABELA 2: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA ANÁLISES DE AMOSTRAS DE PLASMA E SALIVA.

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )
CQB	Fenitoína	15,0
	Fenobarbital	150,0
	Topiramato	10,0
CQM	Fenitoína	200,0
	Fenobarbital	1200,0
	Topiramato	90,0
CQA	Fenitoína	400,0
	Fenobarbital	1800,0
	Topiramato	230,0

Dados: CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração.

Uma alíquota de 1,450 mL de acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio a 1 mM foi adicionada as amostras fortificadas. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 60 segundos, e então centrifugadas por 10 minutos (9000 rpm, 4 °C). O sobrenadante foi analisado por CLAE-EM/EM.

O preparo das amostras de controle de qualidade de diluição (CQD) seguiu outro procedimento. As alíquotas de plasma ou saliva branco (30 µL cada) foram fortificadas com 50 µL de uma mistura de padrões e 50 µL da solução do PI. Em seguida, foi adicionado mais 30 µL de plasma ou saliva branco, e realizada uma homogeneização em vortex por 60 segundos. Posteriormente 30 µL dessa solução foi diluída em Uma alíquota de 1,450 mL de acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 60 segundos, e então centrifugadas por 10 minutos (9000 rpm, 4 °C). O sobrenadante foi analisado por CLAE-EM/EM.

## 4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método por CLAE-EM/EM foi validado de acordo com os critérios estabelecidos na RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. De acordo com essa resolução, para que um método bioanalítico seja considerado adequado, deve atender aos requisitos de seletividade, linearidade (curva de calibração), precisão (intra e intercorrida), exatidão (intra e intercorrida), efeito matriz, efeito residual e estabilidade das amostras e das soluções (BRASIL, 2012).

### 4.8.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação de análises realizadas em matriz de plasma e saliva normal fortificados com fenitoína, fenobarbital, topiramato e prednisona, em concentração correspondente ao limite inferior de quantificação (LIQ) e amostras preparadas nas mesmas condições porém isentas dos analitos de interesse. Para avaliação da seletividade do método em plasma, foram avaliadas quatro alíquotas de plasma normal, um de plasma lipêmico e uma de plasma hemolisado. Já as amostras utilizadas para avaliação da seletividade em saliva foram obtidas de seis voluntários diferentes, sendo 2 (duas) crianças (8 e 13 anos), um jovem do sexo masculino (23 anos), uma jovem do sexo feminino (25 anos), um adulto acima de 50 anos do sexo masculino (62 anos) e um adulto do sexo feminino acima de 50 anos (53 anos). Para a realização deste ensaio, foram adicionados 1,500 mL de acetonitrila:água (90:10) contendo 1 mM de formiato a alíquotas de 30 µL de plasma ou saliva isenta dos analitos de interesse. A amostra foi agitada em vórtex por 60 segundos e, em seguida, submetida à centrifugação por 10 min., a 9000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um vial e utilizado para análise.

Para preparo da amostra fortificada foi aliquoteado 30 µL de plasma ou saliva branco ao qual foi adicionado 25 µL da solução de uma mistura de padrões de fenitoína, fenobarbital e topiramato e 25 µL da solução do padrão interno, de modo a obter as concentrações de 5,0 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 50 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína e 2,5 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 300 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) para as amostras de plasma e

600 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) para as amostras de saliva. As amostras fortificadas foram homogenizadas extraídas e ressuspensas em acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo a 1 mM de formiato de amônio, conforme descrito no item 4.7.

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos devem ser sobrepostos aos obtidos de matriz de plasma e saliva fortificada. Nenhum pico com área superior a 20% da área obtida no LIQ e 5% da área do PI deve ser observado nos respectivos tempos de retenção (BRASIL, 2012).

#### 4.8.2 Efeito Matriz

Para realizar o teste de efeito matriz, foram preparadas oito amostras em solução com as mesmas concentrações do CQB e CQA. Além das amostras em solução, foram utilizadas oito alíquotas de amostras preparadas em plasma conforme item 4.7 sendo quatro plasmas normais, dois lipêmicos e dois hemolisados, e seis alíquotas preparadas em saliva providas de voluntários diferentes, também conforme item 4.7, de modo a obter os mesmos níveis de concentração das soluções de CQB e CQA.

Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme descrito no item 3.7.3. O Coeficiente de Variação (CV%) entre os FMNs relativos às amostras e suas respectivas soluções não deve apresentar valores superiores a 15% (BRASIL, 2012).

#### 4.8.3 Linearidade e Controles de Qualidade

A linearidade foi determinada através do método da padronização interna. As curvas de calibração foram preparadas em quintuplicatas, em sete níveis de concentração, durante três dias consecutivos, conforme descrito no item 4.7 (Tabela 01).

As curvas de calibração foram construídas através do método dos quadrados mínimos, sendo que para cada nível de concentração, o coeficiente de variação (CV%) e o desvio padrão (DP) foram calculados. A regressão linear utilizada foi 1/x.

Para confirmar a linearidade foi calculado o CV% entre o valor obtido experimentalmente e o valor teórico. Não devem ser observadas variações

superiores a 15% em relação a concentração nominal do nível da curva, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20%. Para métodos bionalíticos, é recomendável que o coeficiente de correlação ( $r$ ) seja igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003). As amostras de CQ foram preparadas da mesma maneira que na curva de calibração, conforme descrito no item 4.7, sendo neste caso avaliadas oito réplicas de cada CQ (Tabela 2). O critério de aceitação da curva de calibração exige que 75% dos controles preparados apresentem desvio padrão inferior a 15% quando comparado ao valor nominal, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20% (BRASIL, 2012).

#### 4.8.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas durante três dias consecutivos (intra e intercorrida). Para tanto, foram preparadas oito réplicas de cada um dos controles, conforme descrito no item 4.7, de modo a obter as concentrações descritas na Tabela 2.

A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as concentrações de analitos obtidas experimentalmente, em um mesmo nível de concentração. A exatidão foi calculada através do valor de EPR%, conforme o item 3.7.5 em cada nível de concentração. Para ambos, precisão e exatidão, são exigidos erros menores que 15%, exceto para o CQ-LIQ onde os desvios não devem exceder 20%.

#### 4.8.5 Efeito Residual (*Carryover*)

O teste de *carryover* foi realizado com a finalidade de verificar se há interferência do analito da amostra anterior em amostras posteriores. O ensaio consistiu de injeção de uma amostra branco de plasma ou saliva, seguida da injeção de uma amostra de plasma ou saliva fortificada na concentração do nível mais alto da curva de calibração. Logo após a injeção da amostra fortificada foi re-submetida por duas vezes seguidas a mesma amostra branco, analisada anteriormente. Nenhum pico de interferência significativa (20% da área do LIQ e 5% da área do PI)

deve ser observado nos cromatogramas dos brancos de plasma ou saliva nos mesmos tempos de retenção dos analitos e dos padrões internos (BRASIL, 2012).

#### 4.8.6 Estabilidade

##### 4.8.6.1 Estabilidade de Curta Duração, Pós-Preparativa, após Ciclos de Congelamento e Descongelo e de Longa Duração

Para realizar o teste de estabilidade foram preparadas 6 replicatas de amostras preparadas conforme item 4.7 nas concentrações de CQB e CQA.

Após centrifugação o sobrenadante foi mantido sobre a bancada por 8 horas, a temperatura ambiente. A estabilidade de curta duração foi avaliada por meio de um comparativo entre as áreas dos picos cromatográficos obtidos com as amostras armazenadas, e aquelas obtidas com amostras recém preparadas. Para os testes de estabilidade pós-preparativa, após ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração também foram utilizadas 6 replicatas de CQB e CQA para cada ensaio. O ensaio pós-preparativo avaliou a estabilidade das amostras após 24h de armazenamento no gerenciador de amostras (4 °C em vial), e o teste de congelamento e descongelamento foi realizado após três ciclos de congelamento e descongelamento das amostras preparadas em plasma e saliva (1 ciclo por dia em 3 dias consecutivos). A estabilidade de longa duração foi realizada pela análise de amostras preparadas em plasma e saliva armazenadas em freezer a -40 °C durante 30 dias.

##### 3.8.8.2 Estabilidade das Soluções Estoque e de Trabalho

As soluções estoque avaliadas foram preparadas em metanol e as de trabalho em acetonitrila, conforme o item 4.3. A estabilidade das soluções estoque (1mg mL<sup>-1</sup>) foi avaliada após 6 horas a temperatura ambiente, 24 e 48 horas sob refrigeração (4 °C) e após 30 dias de armazenamento das soluções em freezer na temperatura de -40 °C. No momento das análises, as soluções estoque foram diluídas em solução de acetonitrila contendo 1,0 mM de formiato de amônio (90:10

v/v) de modo a obter as concentrações CQB e CQA. As áreas dos picos cromatográficos obtidos com as soluções de fenobarbital, fenitoína, topiramato e prednisona armazenadas foram comparadas com aquelas obtidas com soluções recém preparadas dos analitos nos mesmos níveis de concentração. A estabilidade das soluções de trabalho foi avaliada com as soluções na concentração de 10000 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 10000 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 10000 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 30000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) para os pontos de CQB e de 100000 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 100000 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 100000 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 30000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) para os pontos de CQA. As amostras foram analisadas após 6 horas sobre a bancada em temperatura ambiente e após armazenamento à 4°C por 24 e 48 horas.

Tanto as soluções estoque quanto as soluções de trabalho não devem apresentar variações superiores a 10% de suas respostas quando comparadas com as respostas de soluções recém preparadas.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Os parâmetros relativos ao espectrômetro de massas foram otimizados para melhorar a ionização dos analitos através de experimentos de infusão direta no espectrômetro de massas de soluções de padrões nas concentrações iniciais de 40000 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 5000 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 500 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 10000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI), separadamente. Foram realizadas análises de varredura (*full scan*) para otimizar as concentrações dos analitos e o modo de ionização que ofereceriam a intensidade de sinal mais adequada, para, então, partir para otimização dos parâmetros individuais. Todos os experimentos foram realizados utilizando acetonitrila 100% adicionada de formiato de amônio 5 mM como solvente principal de diluição dos analitos, uma vez que a acetonitrila é o solvente mais indicado para a precipitação de proteínas, etapa necessária para extração dos fármacos da matriz durante a definição do protocolo de preparo de amostra.

Foram avaliados os modos negativo e positivo de ionização afim de avaliar a melhor condição de ionização dos analitos, ou seja, se eles apresentam uma maior tendência de ganhar ou perder prótons durante o processo de ionização. A literatura propõe que fenobarbital e topiramato são melhores avaliados em modo negativo de ionização, enquanto fenitoína apresentava melhor ionização em modo positivo (KIM *et al.*, 2011; SUBRAMANIAN *et al.*, 2008). Porém, surpreendentemente, nos testes realizados foi observada uma boa ionização da fenitoína também no modo negativo, que, então, tornou-se o modo de ionização mais adequado para a avaliação dos analitos. Foram monitorados os seguintes íon moleculares para análise dos anticonvulsivantes de interesse: [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 251 para a fenitoína, [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 231 para o fenobarbital, [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 338 para o topiramato e [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 357 para a prednisona (PI). Definido o modo de ionização, foi realizada a seleção do aditivo e concentração que a ser adicionado ao solvente de diluição da amostra para facilitar o processo de ionização. Como aditivo para ionização, foi escolhido o formiato de amônio, que é o mais indicado para ionizações em modo negativo. Para isso foi realizada a infusão de amostras contendo 15000 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 1200 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 800 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 5000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) diluídas em acetonitrila

100%, sendo testadas as concentrações de 1mM e 5 mM de formiato de amônio. Não foram observadas diferenças significativas com o aumento da concentração do aditivo, por esse motivo a menor concentração de 1 mM foi selecionada.

Além do aditivo, foi otimizada na solução diluente a proporção de água a ser adicionado à acetonitrila, pois a água também atua como agente facilitador do processo de ionização em fonte de ionização do tipo ESI. Nessas fontes a água contribui com a solvatação das moléculas tornando o processo de ionização mais constante, o que faz com que a intensidade dos ions formados seja mais estável. Inicialmente foi testada a diluição da amostra em solução de acetonitrila:água (50:50, v/v) contendo formiato de amônio a 1 mM. Foi observado que a água nesta concentração auxilia na ionização dos analitos quando comparado com análise sem adição de água, porém foi observada redução na estabilidade do topiramato, com perda do sinal do analito após cerca de uma hora de preparo da amostra (FIGURA 6). Esta perda de sinal pode ser resultado da hidrólise da porção sulfamato da molécula de topiramato.

Foram testadas, então, diferentes proporções de acetonitrila/água até atingir a melhor relação de ionização dos analitos/estabilidade do topiramato, ficando definida como solução diluente para infusão a mistura de acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio a 1 mM.

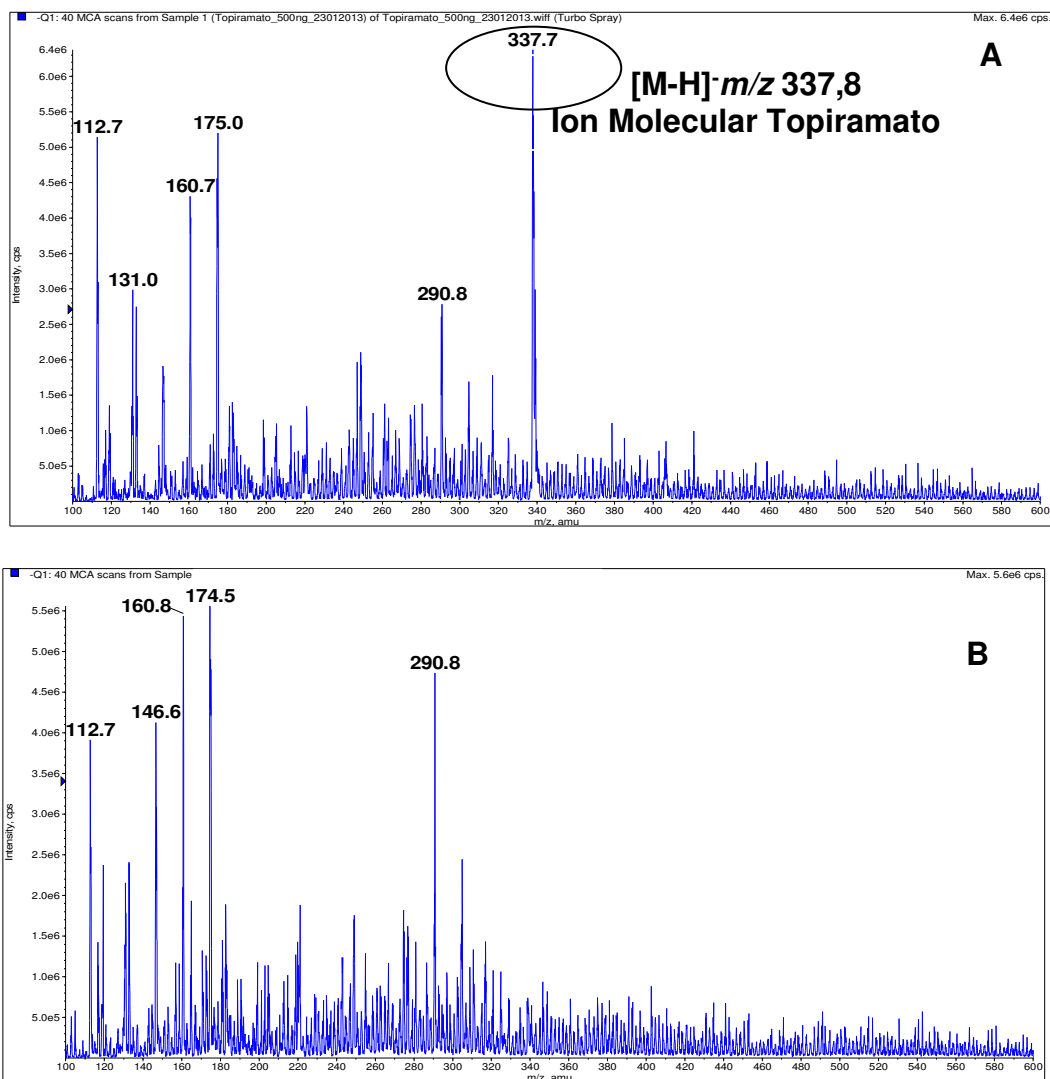


FIGURA 6: INFUSÃO DE SOLUÇÃO DE TOPIRAMATO A 500 ng mL<sup>-1</sup> PREPARADA EM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA:ÁGUA (50:50, V/V) CONTENDO FORMIATO DE AMÔNIO A 1 MM LOGO APÓS O PREPARO (A) E APÓS UMA HORA DE PREPARO (B)

Tendo definido o modo de ionização e a solução diluente, foi verificado pelo experimento de *multiple ions* que os analitos na concentração utilizada apresentam intensidade de sinal ideal para otimização dos parâmetros de fragmentação no experimento de MRM, com intensidade entre de  $2 \times 10^5$  cps e  $1.10^6$  cps para os três analitos. Partiu-se, então, para otimização dos parâmetros de análise por MRM. Durante o experimento de MRM foram otimizados os parâmetros de voltagens DP, EP, CEP, CE e CXP mais adequados para a obtenção dos íons fragmentos mais estáveis dos analitos. Ao final da otimização, as transições de ions selecionadas foram de  $m/z$  251.0  $\rightarrow$  102.0 para quantificação e  $m/z$  251.0  $\rightarrow$  77.0 para qualificação da fenitoína (FIGURA 7);  $m/z$  231.0  $\rightarrow$  85.0 para quantificação e  $m/z$  231.0  $\rightarrow$  188.2 para qualificação do fenobarbital (FIGURA 8);  $m/z$  338.0  $\rightarrow$  78.0 para quantificação e

$m/z$  338.0  $\rightarrow$  96.0 para qualificação do topiramato (FIGURA 9); e  $m/z$  356.8  $\rightarrow$  327.0 para análises de quantificação e  $m/z$  356.8  $\rightarrow$  123.0 para qualificação do PI (prednisona) (FIGURA 10). Os parâmetros otimizados para cada uma das transições estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3: ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA O MONITORAMENTO EM PLASMA E SALIVA DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL, TOPIRAMATO E PREDNISONA (PI)

Composto	Massa Molecular (Da)	Íon Molecular [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	Íon Fragmento Quantif. (m/z)	Íon Fragmento Monitor. (m/z)	<sup>a</sup> CE (eV)	<sup>b</sup> CEP (V)	<sup>c</sup> CXP (V)	<sup>d</sup> DP (V)	<sup>e</sup> EP (V)
Fenitoína	252.3	251.0	102.0	77.0	-28	-14	-2	-45	-7
Fenobarbital	232.2	231.0	85.0	188.2	-16	-12	-2	-35	-5
Topiramato	339.4	338.0	78.0	96.0	-54	-18	0	-50	-6,5
PI	358.4	356.8	327.0	123.0	-10	-18	-6	-35	-10

<sup>a</sup>CE, energia de colisão; <sup>b</sup>CEP, potencial de entrada na cela de colisão; <sup>c</sup>CXP, potencial de saída da cela de colisão; <sup>d</sup>DP, potencial de desagrupamento; <sup>e</sup>EP, potencial de entrada.

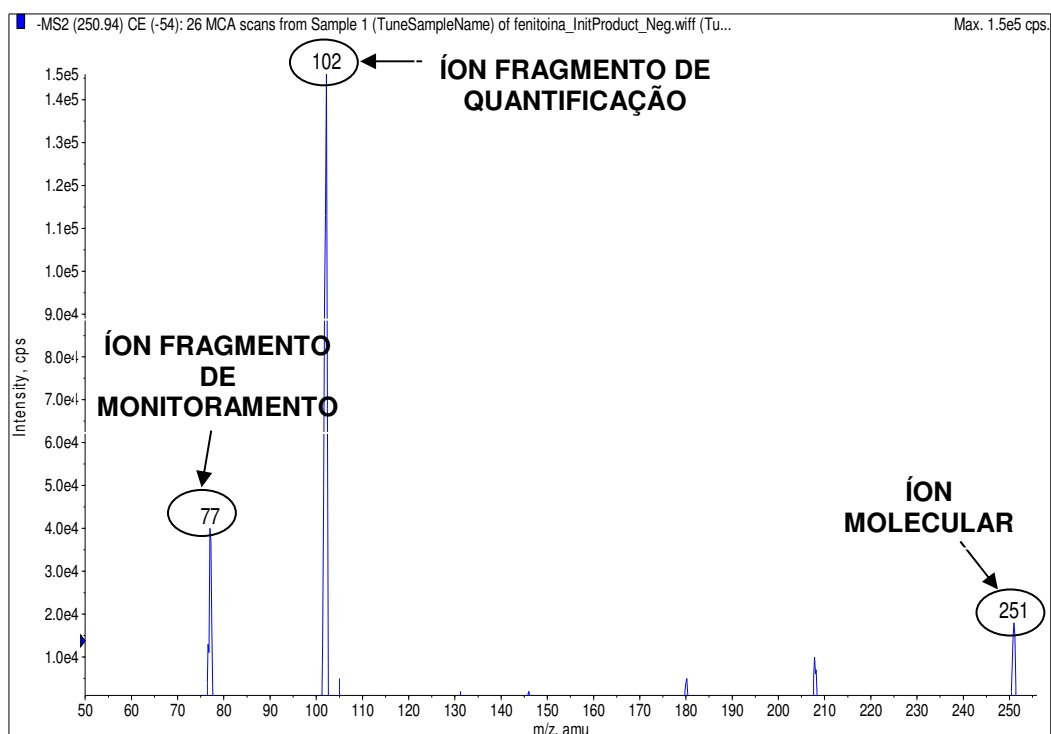


FIGURA 7: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE FENITOÍNA A 1200 ng mL<sup>-1</sup> APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.

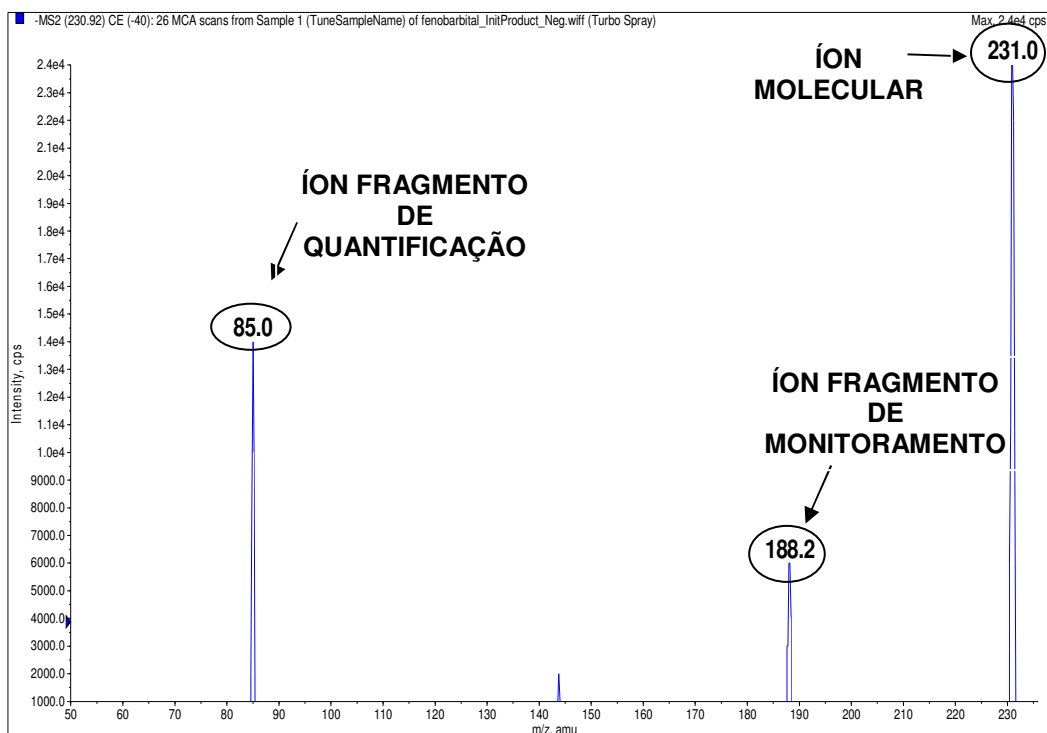


FIGURA 8: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE FENOBARBITAL A 15000 ng mL<sup>-1</sup> APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.

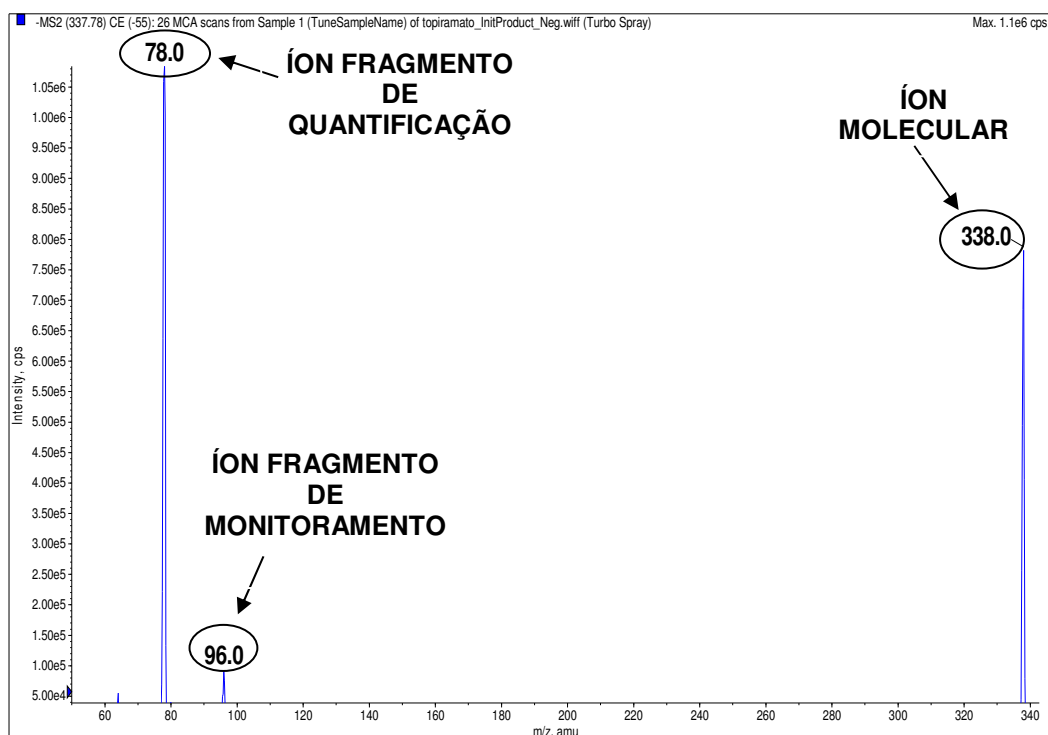


FIGURA 9: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE TOPIRAMATO A 800 ng mL<sup>-1</sup> APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.

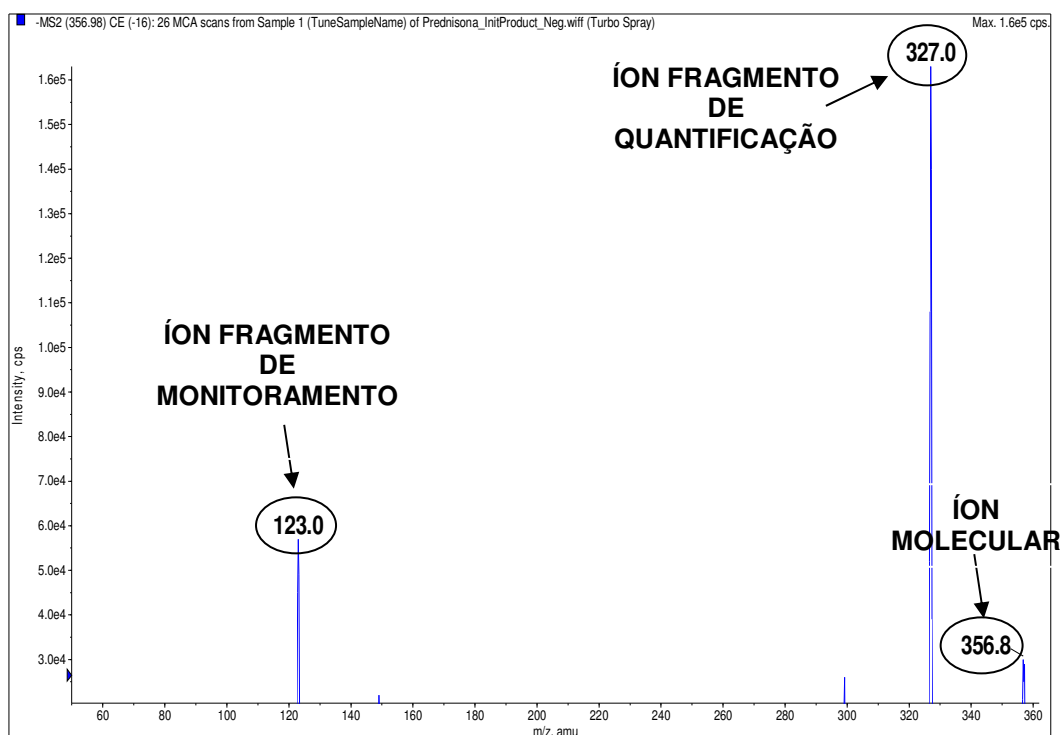


FIGURA 10: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NA ANÁLISE DE PREDNISONA A 5000 ng mL<sup>-1</sup> APÓS FRAGMENTAÇÃO NA CÉLULA DE COLISÃO NO MODO NEGATIVO.

Após a definição das melhores condições de voltagem para detecção dos analitos, foi realizada a otimização dos parâmetros da fonte e analisador (CUR, CAD, IS, GS1, GS2 e TEM) em fluxo mais alto. Esse procedimento é realizado através da análise por infusão em fluxo (FIA), na qual ocorre o acoplamento do cromatógrafo a líquido ao espectrômetro de massas, sem a presença de coluna cromatográfica. Esta etapa objetiva otimizar os parâmetros necessários para ionização dos analitos frente ao alto fluxo de fase móvel provindo da análise cromatográfica. O fluxo utilizado para esse ensaio foi de 200  $\mu\text{L min}^{-1}$  em modo de eluição isocrática. Foi utilizada como fase móvel a mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) contendo formiato de amônio a 1mM.

Ficaram definidos os seguintes parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): -4000 V, temperatura: 450 °C, gás de interface (CUR): 18 psi, gás de colisão (CAD): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 40 psi e gás secante (GS2): 45 psi.

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CLAE-EM/EM

Após a otimização dos parâmetros do analisador e da fonte de ionização, focou-se na otimização dos parâmetros de cromatografia. Para este ensaio utilizou-

se uma mistura dos padrões de anticonvulsivantes contendo 5000ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 600 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 200 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 2100 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) diluídos em acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo 1 mM de formiato de amônio.

Primeiramente foi realizado um teste a partir de método desenvolvido por Kim e colaboradores (2011), que propunha a análise de 10 anticonvulsivantes simultaneamente em plasma, entre eles a fenitoína e o topiramato. Para este teste utilizou-se uma coluna Luna C-18 100 x 2,1 mm, 3 µm em sistema gradiente composto por 60% de fase móvel A (tampão formiato de amônio pH 7,8) e 40% de fase móvel B (acetonitrila/água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio a 5 mM) com fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Porém o método se apresentou muito longo, com cerca de 12 minutos, e com formação de sinais pouco simétricos, o que pode prejudicar a integração no momento da quantificação dos analitos.

Posteriormente, acoplou-se a coluna *X-Bridge Shield* RP18 150 x 2,1mm, 5 µm de tamanho de partícula ao sistema. Foi testada inicialmente para esta coluna a eluição isocrática com diferentes proporções de fase móvel A (tampão formiato de amônio na concentração de 5 mM com pH ajustado para 7,6) e fase móvel B (acetonitrila), conforme tabela 4.

TABELA 4: DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASE MÓVEL TESTADAS PARA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBILTA, TOPIRAMATO E PI NO MODO DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA ISOCRÁTICA

TESTE	<sup>a</sup> Concentração Fase Móvel A (%)	<sup>b</sup> Concentração Fase Móvel B(%)	Resultados
Teste 1	60	40	Sinais assimetricos, boa separação, porém sinais atrasados.
Teste 2	20	80	Sinais simétricos, co-eluição
Teste 3	40	60	Sinais assimétricos, leve separação
Teste 4	50	50	Sinais assimétricos, leve separação
Teste 5	30	70	Sinais assimétricos, leve separação

NOTA: <sup>a</sup> Fase móvel A: tampão formiato de amônio na concentração de 5 mM com pH ajustado para 7,6<sup>b</sup> Fase Móvel B: Acetonitrila em fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>.

Observou-se que quanto maior a proporção de acetonitrila, melhor a simetria dos sinais observados. Porém, ao se elevar a concentração de acetonitrila, os sinais co-eluem e saem muito próximos ao volume morto da coluna. Como se trata de uma análise através do experimento de MRM, a separação dos compostos não é crucial, pois são monitoradas transições específicas, não havendo interferência por sobreposição. Contudo, é interessante realizar a separação dos analitos para evitar que interferentes da matriz possam influenciar na quantificação dos fármacos, uma vez que o plasma e a saliva são matrizes bastante complexas. Assim, foram realizados novos testes, agora através do sistema de eluição por gradiente, no qual a proporção de solventes foi alterada no decorrer da corrida. Foram testadas três diferentes condições (TABELA 5), até se conseguir uma separação e formato de sinais satisfatória, que além da boa separação dos analitos, garantisse a limpeza e re-estabilização da coluna para a próxima corrida cromatográfica.

TABELA 5: DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASE MÓVEL TESTADAS PARA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITA, TOPIRAMATO E PI NO MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE

TESTE	Tempo (min)	<sup>a</sup> Concentração Fase Móvel A (%)	<sup>b</sup> Concentração Fase Móvel B (%)	Resultado
TESTE 1	0,0	60	40	Sinais separam muito no final da corrida. Intensidade e simetria do sinal não satisfatória
	2,0	40	60	
	4,0	20	80	
	5,0	20	80	
	6,0	40	60	
	8,0	60	40	
TESTE 2	0,0	60	40	Sinais separam muito no final da corrida. Simetria do sinal não satisfatória, principalmente da fenitoína
	0,7	60	40	
	4,0	20	80	
	6,0	20	80	
	8,0	30	40	
TESTE 3	0,0	50	50	Melhor separação dos sinais em menor tempo de corrida cromatográfica. Boa simetria dos sinais
	0,1	50	50	
	4,5	25	75	
	8,5	50	50	

NOTA: <sup>a</sup> Fase móvel A: tampão formiato de amônio na concentração de 5 mM com pH ajustado para 7,6 <sup>b</sup> Fase Móvel B: Acetonitrila em fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>.



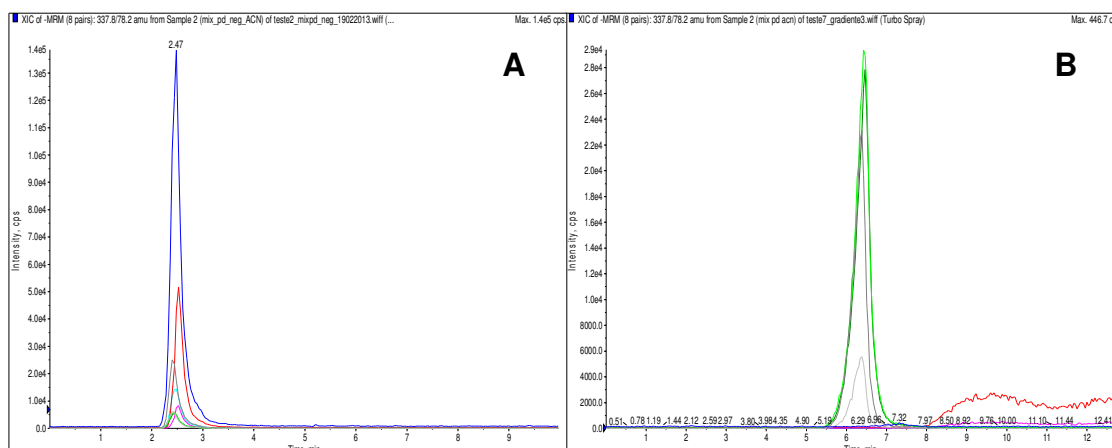


FIGURA 11: EXEMPLO DE CROMATOGRAMA OBTIDO DURANTE ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL E TOPIRAMATO NO MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO - TESTE 2 (A) E NO MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE – TESTE 2 (B)

Foram testadas também diferentes concentrações de tampão formiato de amônio (1 mM e 5 mM) e a influência do ajuste do pH. Pelos resultados obtidos, evidenciou-se que sem o ajuste de pH o sinal cromatográfico prejudica a simetria dos sinais visualizados (FIGURA 12), o que torna o ajuste de pH essencial para uma boa definição de picos. Observou-se também que a utilização de formiato de amônio na concentração de 1mM ou 5 mM não influencia no resultado final da análise.

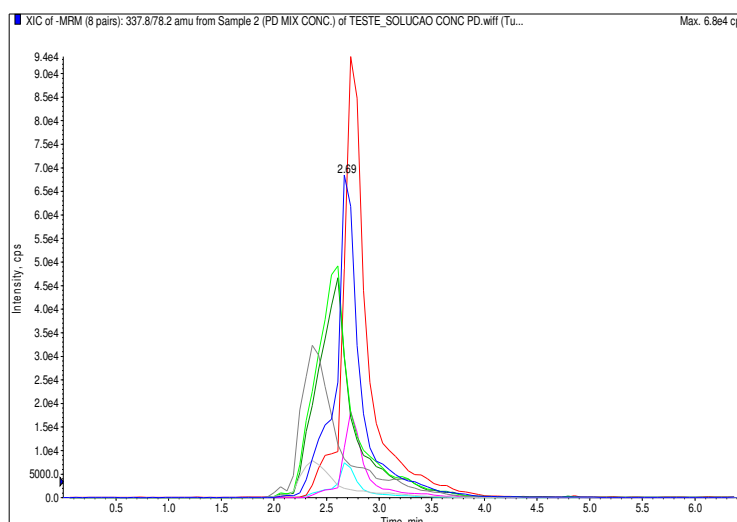


FIGURA 12: EXEMPLO DE CROMATOGRAMA OBTIDO DURANTE ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL, TOPIRAMATO E PI NO MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE – TESTE 3 SEM AJUSTE DE pH.

Considerando todas as condições avaliadas, definiu-se que para os analitos em questão a melhor eficiência e formato de sinais foram obtidos utilizando as seguintes condições cromatográficas:

- Solução diluente: acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo 1 mM de formiato de amônio;
- Fase móvel: Solução tampão de formiato de amônio na concentração de 1 mM com pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio (A) e acetonitrila 100% (B). A fase móvel foi eluída em modo gradiente, conforme segue: tempo 0 : A= 50%; tempo 0,01– 4,5 min: A= 25%; tempo 4,5 – 8,5 min: A= 50%;
- Fluxo da fase móvel: 200  $\mu\text{Lmin}^{-1}$ ;
- Coluna: XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm), 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna XBridge RP18 (10 x 2,1 mm), 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula (Waters Corporation, Mildford, EUA);
- Temperatura da coluna: 20  $^{\circ}\text{C}$ ;
- Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ;
- Fonte de ionização: ESI operando no modo negativo de ionização;
- Aquisição dos dados: *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) com *dwell time* de 450 ms;
- Tempo de aquisição de dados: 6,5 min.

O método desenvolvido foi capaz de analisar fenitoína, fenobarbital e topiramato de forma rápida, apresentado uma excelente sensibilidade tanto para os analitos quanto para o PI (prednisona).

O cromatograma do método desenvolvido pode ser observado na Figura 13.

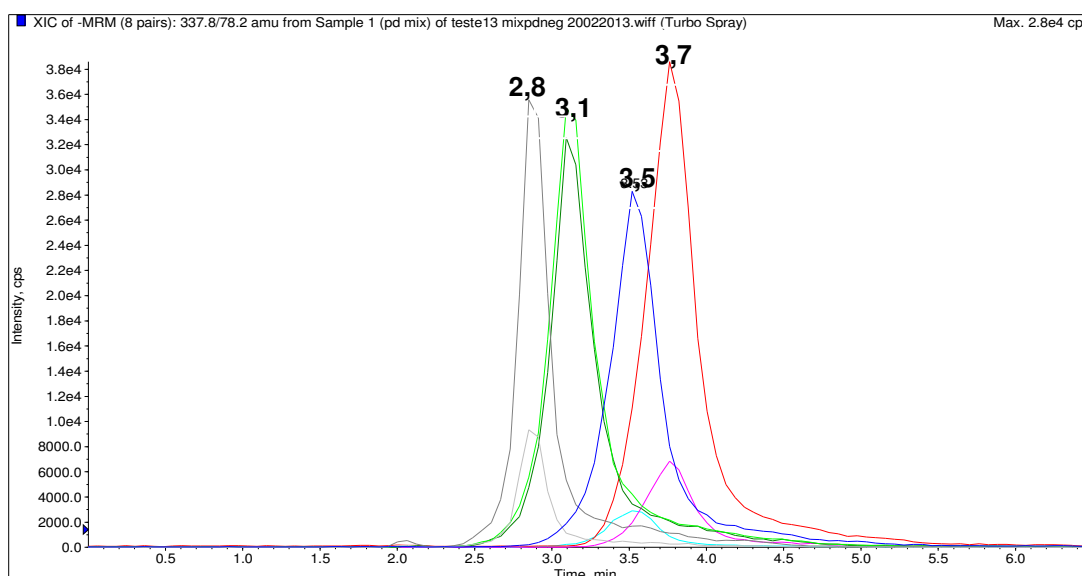


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM FENITOÍNA 600  $\text{ng mL}^{-1}$ , FENOBARBITAL 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , TOPIRAMATO 200  $\text{ng mL}^{-1}$  e PI 200  $\text{ng mL}^{-1}$ .

### 5.3 EXTRAÇÃO DOS ANTICONVULSIVANTES DO PLASMA E SALIVA BRANCOS FORTIFICADOS

A fim de verificar a melhor forma de extração dos analitos e PI das matrizes, foram analisados o coeficiente de variação e a recuperação entre sextuplicatas de amostras por duas formas distintas de extração: a precipitação direta de proteínas com coleta do sobrenadante e a precipitação de proteínas seguida por concentração através de secagem e posterior ressuspensão.

Para análise de extração de proteínas seguida de concentração por secagem foi seguido protocolo padrão do laboratório que considera 100 µL de matriz, adição de 950 µL de acetonitrila, secagem em ultracentrífuga a vácuo e ressuspensão em 100 µL de solução diluente.

Já para análise de precipitação direta de proteínas com coleta de sobrenadante, seguiu-se o método com alterações de Know-Bok Kim e colaboradores (2011), apenas elevando-se proporcionalmente a quantidade de amostra de 10 µL para 30 µL e o volume final de solução, de 500 µL para 1500 µL, afim de aumentar a tomada de amostras e reduzir o erro intrínseco de pipetagens muito baixas. Assim foram realizados testes com precipitação direta de 30 µL de plasma branco e 30 µL de saliva branco com 1490 µL de acetonitrila 100%. Como os testes de otimização de ionização iniciais indicaram que a melhor condição de preparo de amostra para realização das análises seria uma mistura de acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo formiato de amônio a 1 mM, também foram realizados testes comparativos nessa condição, trocando-se a acetonitrila 100% pela solução de diluição.

Na tabela 6 é possível comparar os resultados obtidos em área (cps) para condição de extração em matriz de plasma e na tabela 7 para matriz saliva com suas respectivas recuperações quando comparado com controles preparados em solução.

TABELA 6: COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE ANTICONVULSIVANTES EM TESTES COM DIFERENTES FORMAS DE EXTRAÇÃO EM PLASMA.

Condição de Extração	Analito	Área Média (cps)± DP	<sup>a</sup> CV(%)	<sup>b</sup> Recuperação (%)
Precipitação direta ACN 100%	Fenitoína	9730 ± 100	1,32	91,9
	Fenobarbital	17980 ± 3600	19,90	83,2
	Topiramato	24620 ± 1700	6,93	96,1
	Prednisona (PI)	18244 ± 1435	7,87	86,1
Precipitação direta ACN:H <sub>2</sub> O(90:10) + formiato de amônio1 mM	Fenitoína	10500 ± 400	3,69	95,6
	Fenobarbital	21370 ± 700	3,16	96,5
	Topiramato	26370 ± 600	2,42	96,7
	Prednisona (PI)	18992 ± 923	4,86	102,7
Precipitação seguida por concentração por secagem e ressuspensão	Fenitoína	8320 ± 200	2,36	81,7
	Fenobarbital	14410 ± 2000	14,26	72,6
	Topiramato	20450 ± 1500	2,40	85,4
	Prednisona (PI)	10921 ± 479	4,38	66,8

NOTA: n=6; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais; <sup>b</sup> Expressa sobre a área de amostras analisadas sem adição de matriz

TABELA 7: COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE ANTICONVULSIVANTES EM TESTES COM DIFERENTES FORMAS DE EXTRAÇÃO EM SALIVA

Condição de Extração	Analito	Área Média (cps)± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> Recuperação (%)
Precipitação direta ACN pura	Fenitoína	10600 ± 1200	4,31	94,1
	Fenobarbital	18630 ± 2000	9,04	84,9
	Topiramato	25630 ± 1700	4,84	95,2
	Prednisona (PI)	21199 ± 840	3,97	87,9
Precipitação direta ACN:H <sub>2</sub> O(90:10) + 1 mM formiato de amônio	Fenitoína	11000 ± 400	3,51	96,4
	Fenobarbital	22140 ± 900	4,05	95,8
	Topiramato	27260 ± 800	3,06	96,1
	Prednisona (PI)	18491± 662	3,58	98,6
Precipitação seguida por concentração por secagem e ressuspensão	Fenitoína	08100 ± 200	1,82	80,8
	Fenobarbital	14330 ± 2000	10,29	76,2
	Topiramato	20330 ± 3000	3,86	87,4
	Prednisona (PI)	14428 ± 911	5,55	70,1

NOTA: n=6; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a área de amostras analisadas sem adição de matriz.

Os resultados apresentados demonstram que o coeficiente de variação entre as amostras, principalmente em relação ao fenobarbital, foram maiores com o preparo de amostra por precipitação direta em acetonitrila 100% e pelo processo de concentração por secagem, além disso observa-se que nessas duas condições a recuperação dos ativos em relação a amostras controle em solução ficaram em torno de 80% no processo de concentração por secagem e de 90% na precipitação direta por proteínas. Assim, optou-se pela utilização da condição de extração por precipitação direta das proteínas em acetonitrila:água (90:10, v/v) contendo 1 mM de formiato de amônio para prosseguimento das análises, uma vez que proporcionou a melhor intensidade de sinal, além de melhor recuperação quando comparada com análise sem adição de matriz, e melhor reprodutibilidade, tanto para plasma quanto saliva.

Como a concentração plasmática e salivar esperada para cada farmaco é alta (cerca de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o fenobarbital, 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o topiramato e 20 ng  $\text{mL}^{-1}$  para a fenitoína) a precipitação direta das proteínas se torna uma ferramenta bastante útil para análises de monitoramento terapêutico, pois apresenta uma série de vantagens no momento da realização da análise:

- Necessidade de pequena quantidade de amostra;
- Menor efeito residual da matriz, não havendo necessidade de uso de colunas de separação em fase sólida (SPE) para limpeza de interferentes da matriz;
- Preparo de análise rápido;
- Não há necessidade de presença de sistema de concentração de amostras no laboratório.

#### 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de métodos bioanalíticos é composta de diversas análises que objetivam comprovar que o método é efetivo para o fim ao qual se propõe. Para isso, foram realizados ensaios em matriz fortificada com diferentes concentrações dos anticonvulsivantes de interesse seguindo o pressuposto pela RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. O método se mostrou adequado na análise de matrizes de plasma e saliva fortificados, então, está apto para avaliar os analitos em amostras reais de monitoramento terapêutico.

#### 5.4.1 Seletividade

O teste de seletividade objetivou verificar se não existem sinais significativos de componentes da matriz que interfiram na quantificação dos analitos de interesse.

Na validação do método para matriz de plasma foram utilizadas seis amostras distintas, sendo 4 (quatro) amostras de plasma normal, 1 (uma) de plasma lipêmico e 1 (uma) de plasma hemolisado. Já para validação do método em saliva foram avaliadas 6 (seis) amostras de saliva de voluntários, sendo 2 (duas) de crianças (8 e 13 anos), 1 (uma) de jovem do sexo masculino (23 anos), 1 (uma) jovem do sexo feminino (25 anos), 1 (uma) adulto acima de 50 anos do sexo masculino (62 anos) e 1 (uma) de adulto do sexo feminino acima de 50 anos (53 anos).

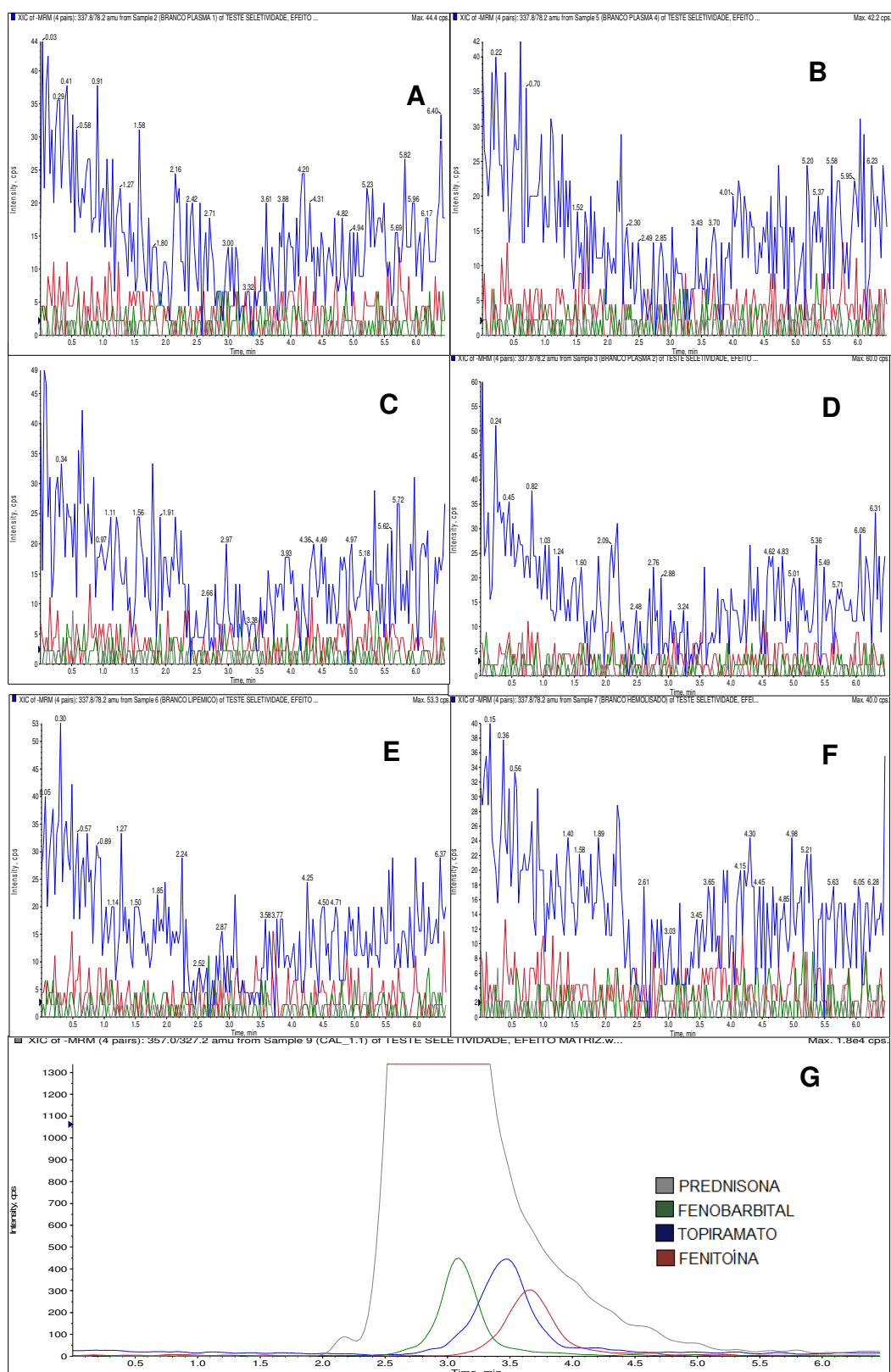


FIGURA 14: TESTE DE SELETIVIDADE EM AMOSTRAS BRANCO DE PLASMA NORMAL (A, B, C, D) DE PLASMA HEMOLISADO (E), DE PLASMA LIPÊMICO (F) E DA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL E TOPIRAMATO NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ EM PLASMA (G)

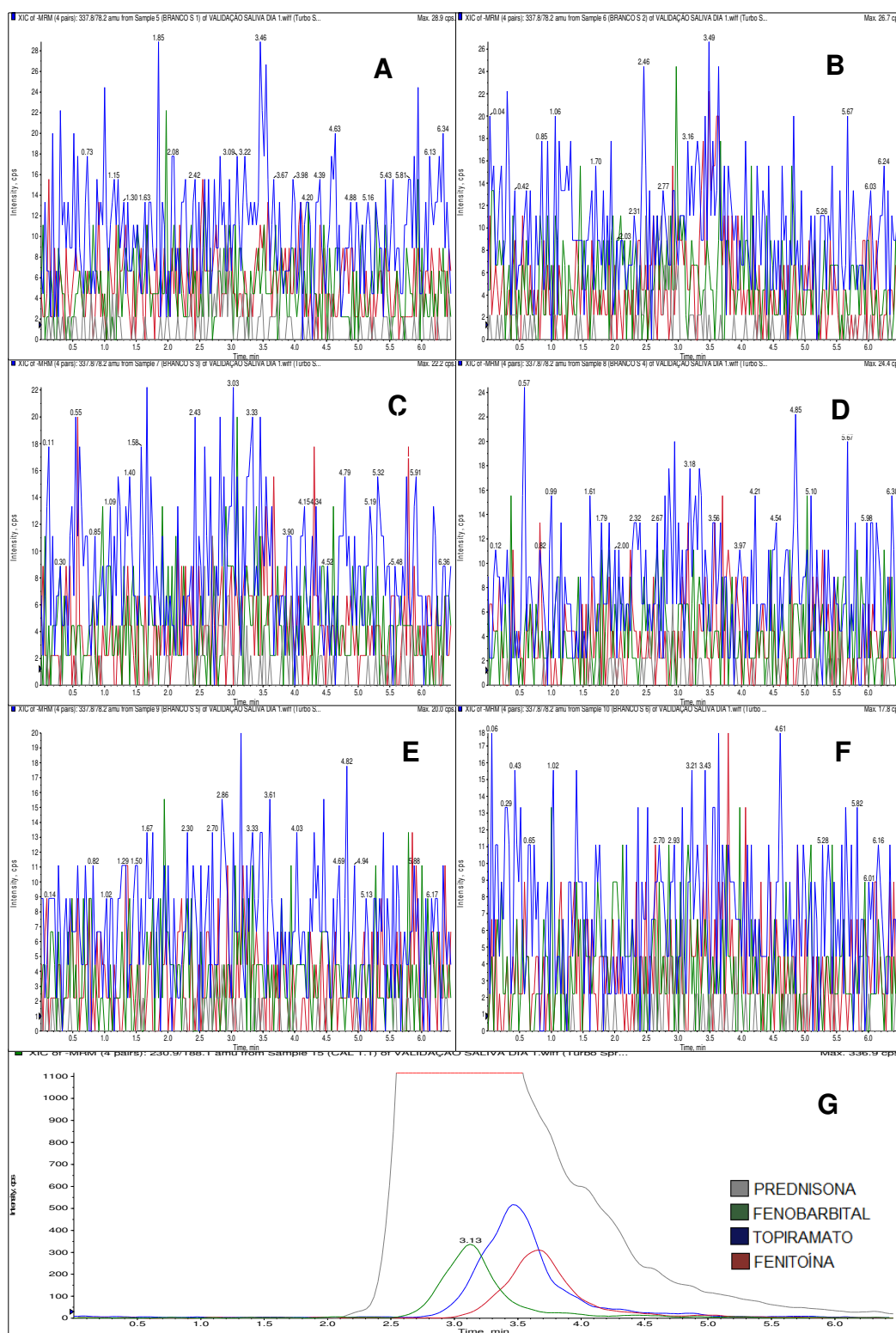


FIGURA 15: TESTE DE SELETIVIDADE EM AMOSTRAS DE SALIVA BRANCO OBTIDAS DE CRIANÇAS (A E B), DE ADULTO JOVEM DO SEXO MASCULINO (C), DE ADULTO JOVEM DO SEXO FEMININO (D), DE ADULTO ACIMA DE 50 ANOS DO SEXO MASCULINO (E), DE ADULTO ACIMA DE 50 ANOS DO SEXO FEMININO (F) E DA ANÁLISE DE FENITOÍNA, FENOBARBITAL E TOPIRAMATO NA CONCENTRAÇÃO DE LIQ EM SALIVA (G).



Pelas figuras 14 e 15 não se observa a presença de sinais interferentes nas amostras branco de plasma e saliva analisadas que possam influenciar nas análises dos fármacos. Como a legislação propõe que não sejam observados sinais que correspondam a 20% do sinal gerado pelos analitos de interesse, a cada figura também foi adicionado um cromatograma dos anticonvulsivantes na concentração esperada para o LIQ do método. Assim, pode-se afirmar que o método é seletivo para as análises de fenitoína, fenobarbital, topiramato e PI em matrizes de plasma e saliva. Essa grande seletividade alcançada é resultado principalmente da técnica utilizada para as análises, a espectrometria de massas. Esse tipo de análise é um dos mais seletivos disponíveis no mercado analítico, uma vez que é capaz de monitorar tanto o íon molecular de interesse quanto de seus fragmentos. Outro fator que merece destaque é a utilização de apenas 30µL de amostra biológica para realização da análise, que contribui ainda mais para o alcance da seletividade desejada para o método.

#### 5.4.2 Efeito Residual

O teste de efeito residual objetivou avaliar se resíduos de injeção dos analitos nos amostradores ou gerenciadores de amostras não estão ficando retidos na agulha entre uma injeção e outra ou na coluna durante a corrida cromatográfica. Os resíduos de amostra no sistema podem elevar a concentração dos analitos em algumas amostras, gerando resultados falso positivos. Sua avaliação foi feita através da injeção de uma amostra branco, de uma amostra na concentração do limite superior de quantificação (LSQ) proposto pelo método e, finalmente, duas injeções da mesma amostra branco injetada no início do ensaio. Pelos resultados observados nas figuras 16 e 17, o método desenvolvido não apresenta efeito residual tanto para matriz de plasma quanto para matriz de saliva, uma vez que não se observa a formação de sinal que corresponda a 20% da área dos LIQs no tempo de retenção específico de cada analito, conforme comparativo com o espectrograma E de cada figura. Esse resultado é reflexo de duas lavagens da agulha realizadas após cada injeção de amostra, sendo a primeira realizada em metanol e a segunda em acetonitrila, que garantem a limpeza da agulha de injeção. Outro fator que corrobora

com este resultado é o aumento da concentração de acetonitrila no final da corrida cromatográfica, que auxilia na limpeza da coluna de uma análise para outra.

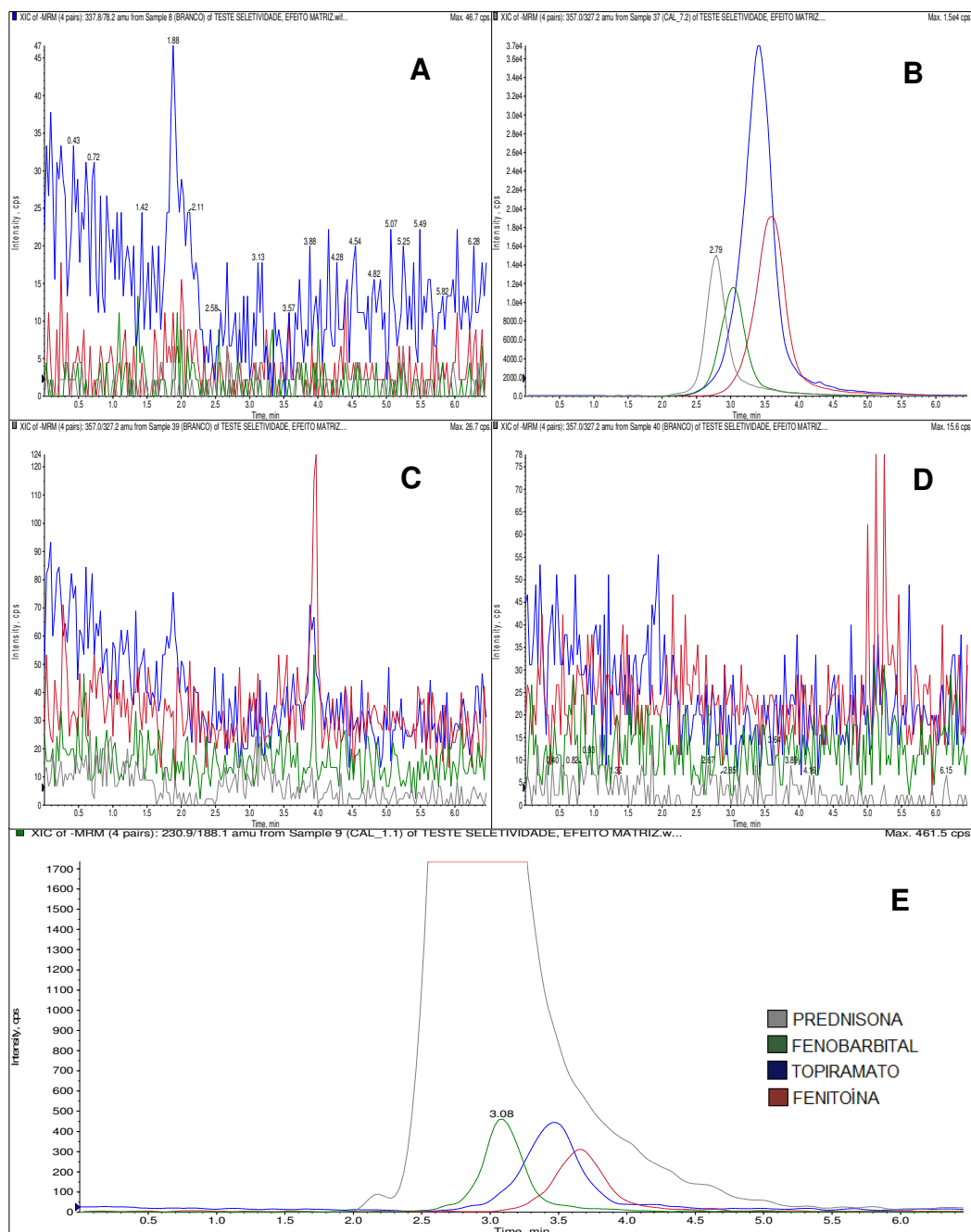


FIGURA 16: CROMATOGRAMA DE SINAIS OBTIDOS DE ANÁLISES DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO ANTES DA ANÁLISE DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (A), AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (B), AMOSTRA DE PLASMA BRANCO APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (C E D) E AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LIQ.

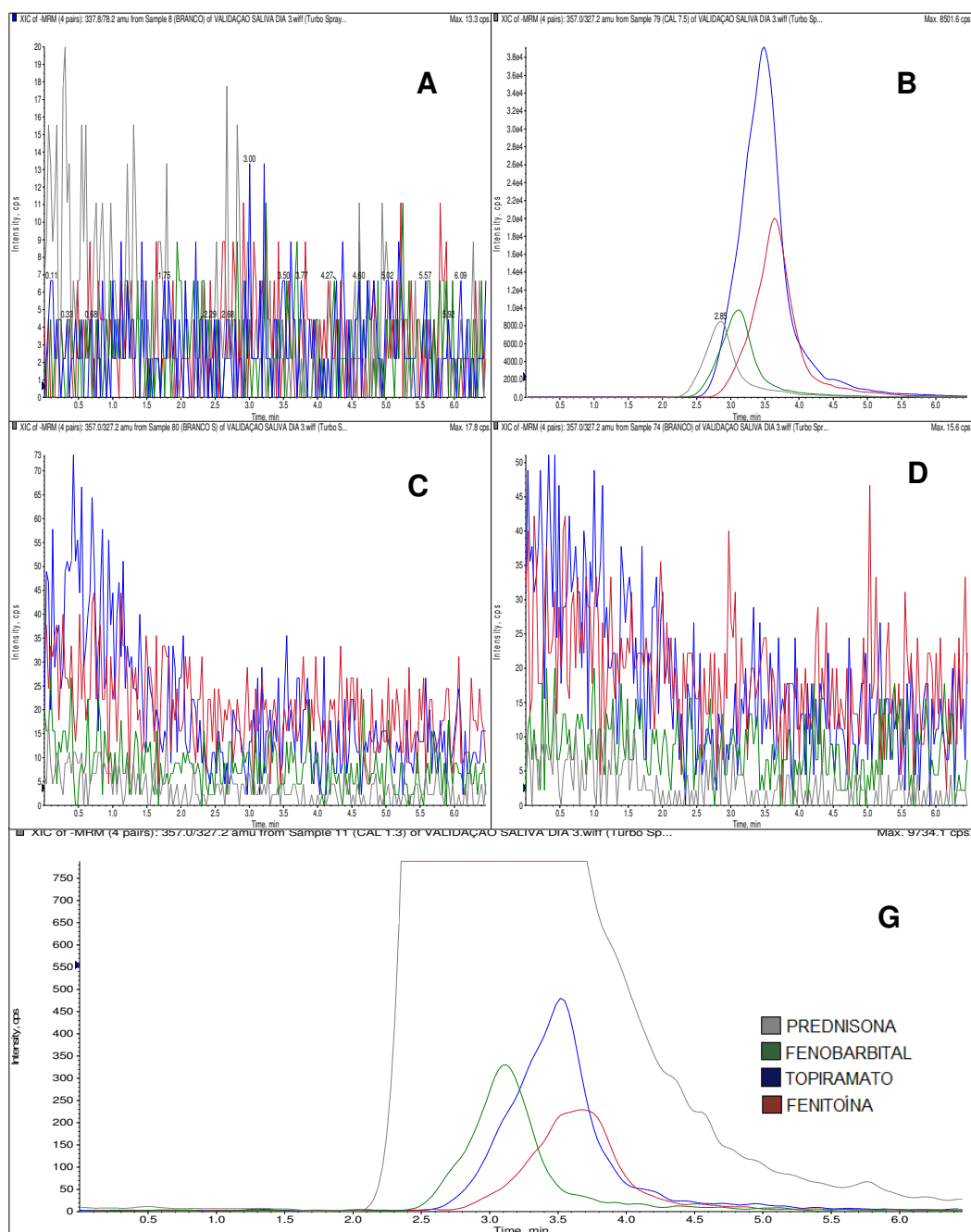


FIGURA 17: CROMATROGRAMA DE SINAIS OBTIDOS DE ANÁLISES DE AMOSTRAS DE SALIVA BRANCO ANTES DA INJEÇÃO DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (A), AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (B), AMOSTRA DE SALIVA BRANCO APÓS A INJEÇÃO DE AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LSQ (C E D) E AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO DO LIQ.

#### 5.4.3 Limite inferior de detecção (LID) e de quantificação (LIQ)

O limite de detecção pode ser definido como a concentração abaixo da qual não é possível distinguir de maneira precisa se o sinal geral no espectro é proveniente do composto de interesse ou apenas alteração da linha de base. Considerou-se o limite inferior de detecção o sinal que apresentou uma relação sinal/ruído maior que 3 (três), ou seja, um sinal de intensidade três vezes acima da intensidade da linha de base. Obteve-se relação sinal/ruído próxima de 3 em amostras contendo 0,8 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 6,6 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital e 0,375 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato, sendo esses valores válidos tanto para matriz de plasma (FIGURA 18) quanto para saliva (FIGURA 19).

Já o limite de quantificação amplamente aceito em ensaios de validação dispõe uma relação sinal/ruído mínima de 10. Porém a resolução mais recente que trata da validação de métodos bioanalíticos no Brasil, a resolução RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012, não determina esse tipo de teste. A resolução apenas descreve os critérios mínimos para a escolha de uma concentração como sendo o limite inferior de quantificação: um sinal de resposta do analito no LIQ identificável e reproduzível com precisão de no mínimo 80% e exatidão de 80 – 120% (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras em 3 (três) dias consecutivos (BRASIL, 2012).

Assim, para garantir uma melhor linearidade e exatidão do método, o limite inferior de quantificação estabelecido tanto para plasma (FIGURA 20) quanto para saliva (FIGURA 21) foi de 5 ng mL<sup>-1</sup> para a fenitoína, 50 ng mL<sup>-1</sup> para o fenobarbital e de 2,5 ng mL<sup>-1</sup> para o topiramato. Conforme dados obtidos dos ensaios de precisão e exatidão realizados (apresentados no item 5.4.6), nessas concentrações as respostas de precisão e exatidão do LIQ demonstraram resultados bastante abaixo dos desvios máximos indicados, garantindo a qualidade analítica do método desenvolvido. Além disso, essas concentrações atendem a necessidade analítica de quantificação de fenitoína, fenobarbital e topiramato em matrizes de plasma e saliva para monitoramento terapêutico, conforme será discutido no item 5.4.5 que discorre a respeito do ensaio de linearidade.

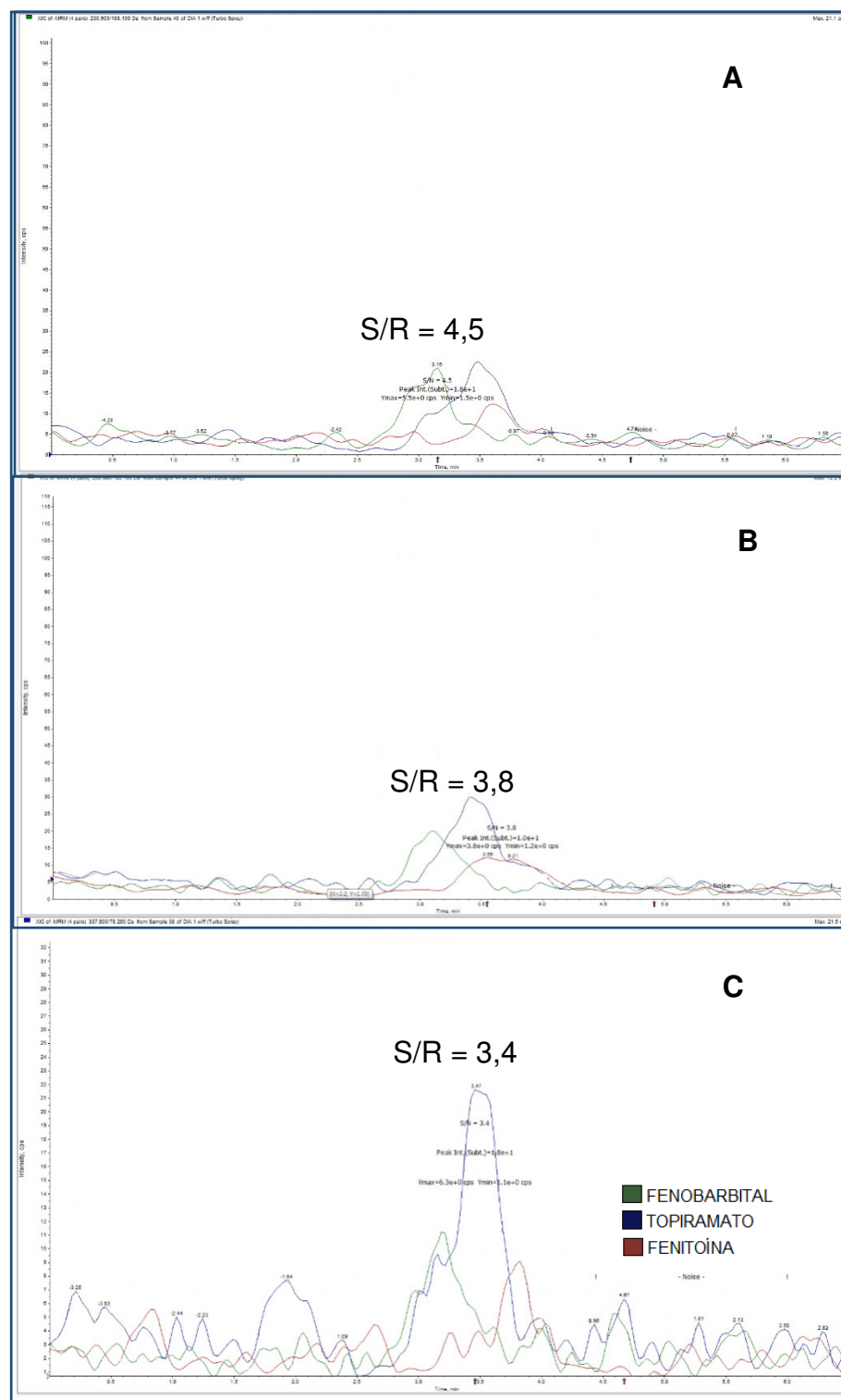


FIGURA 18: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ DE PLASMA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,8 ng mL<sup>-1</sup> PARA A FENITOÍNA (A), 6,6 ng mL<sup>-1</sup> PARA O FENOBARBITAL (B) E DE 0,375 ng mL<sup>-1</sup> PARA O TOPIRAMATO (C) E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).

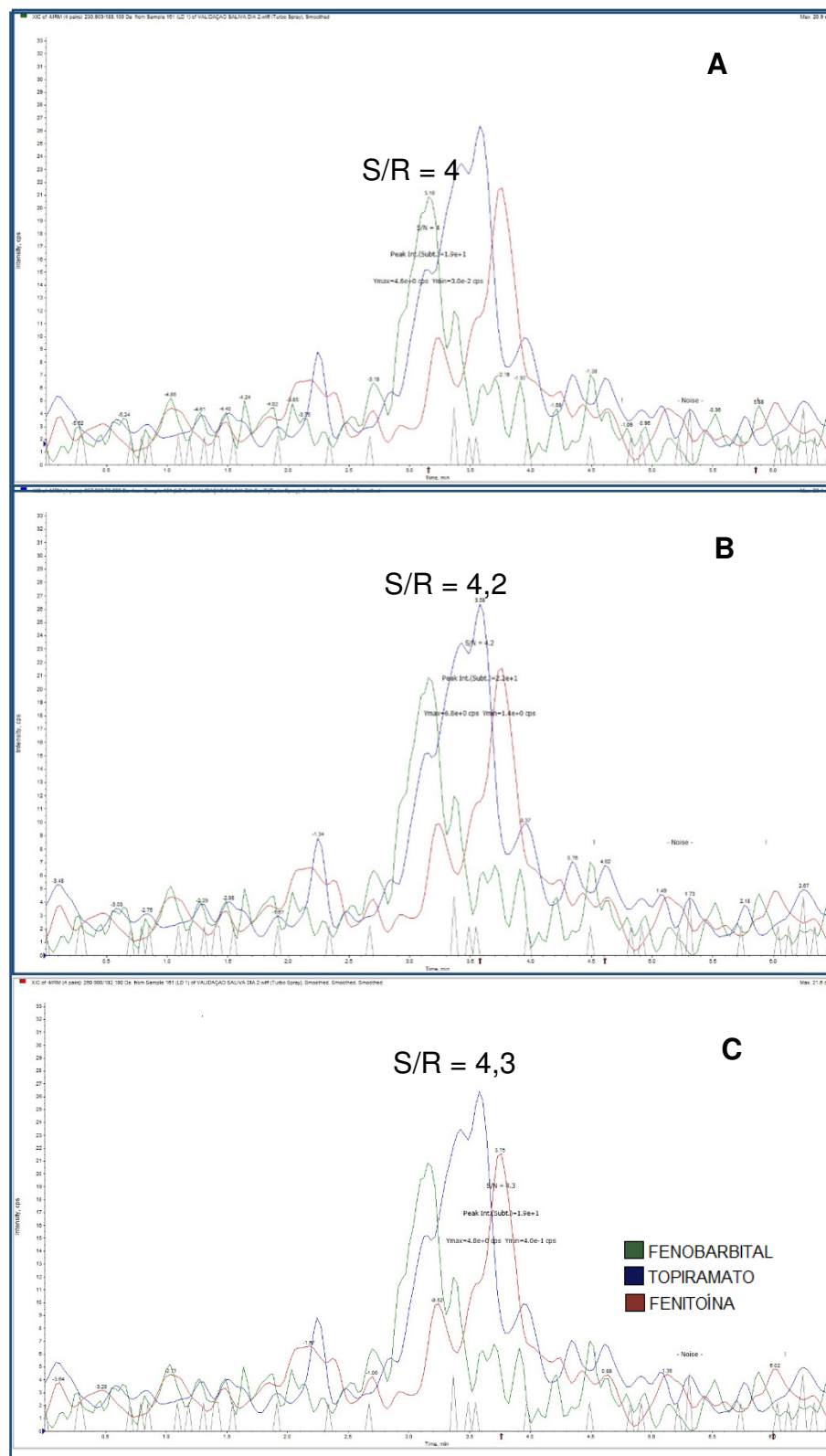


FIGURA 19: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ DE SALIVA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,8 ng.mL<sup>-1</sup> PARA A FENITOÍNA (A), 6,6 ng.mL<sup>-1</sup> PARA O FENOBARBITAL (B) E DE 0,375 ng.mL<sup>-1</sup> PARA O TOPIRAMATO (C) E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).

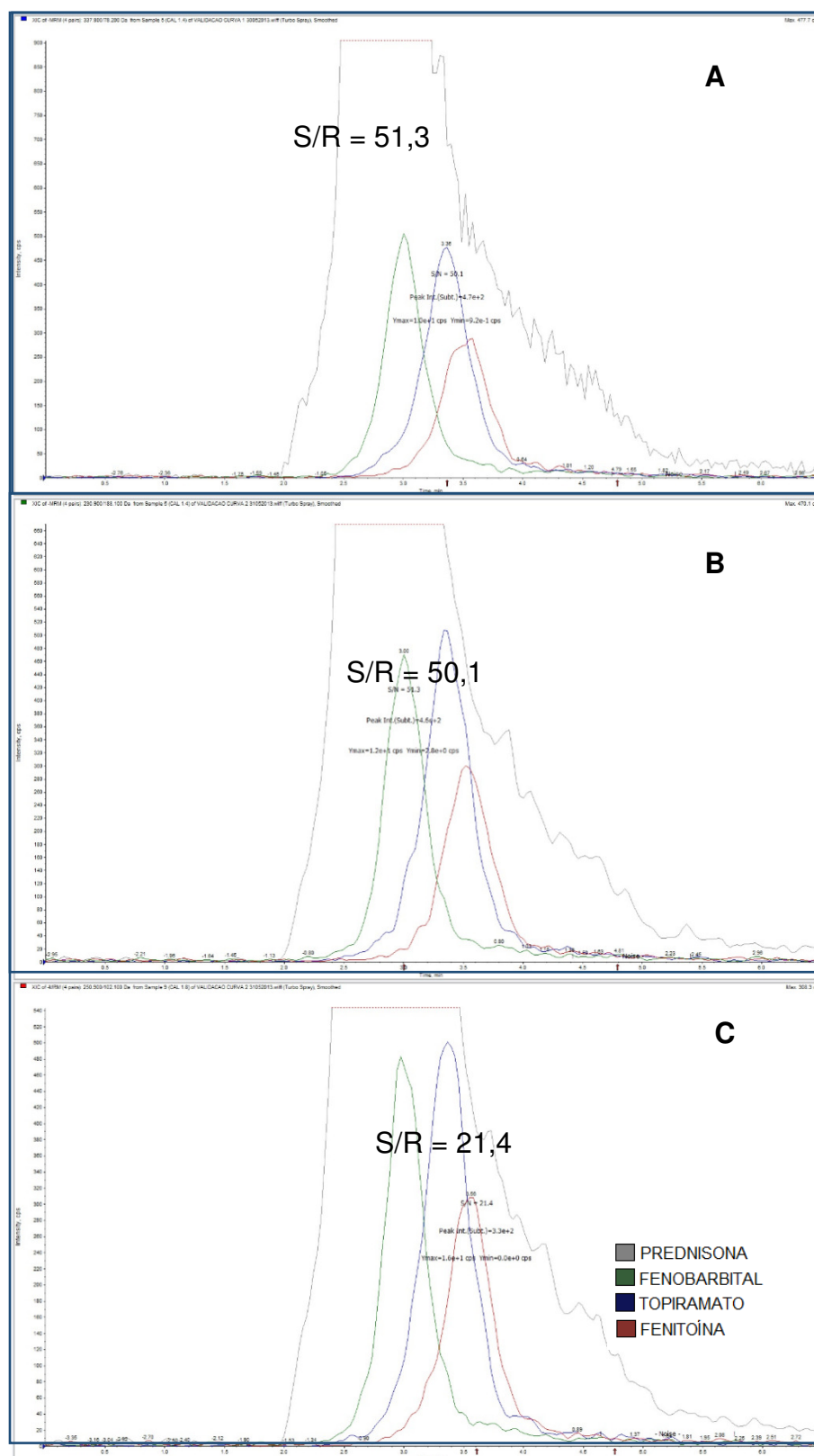


FIGURA 20: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ PLASMA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$  PARA A FENITOÍNA (A),  $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$  PARA O FENOBARBITAL (B) E DE  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$  PARA O TOPIRAMATO (C) E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).

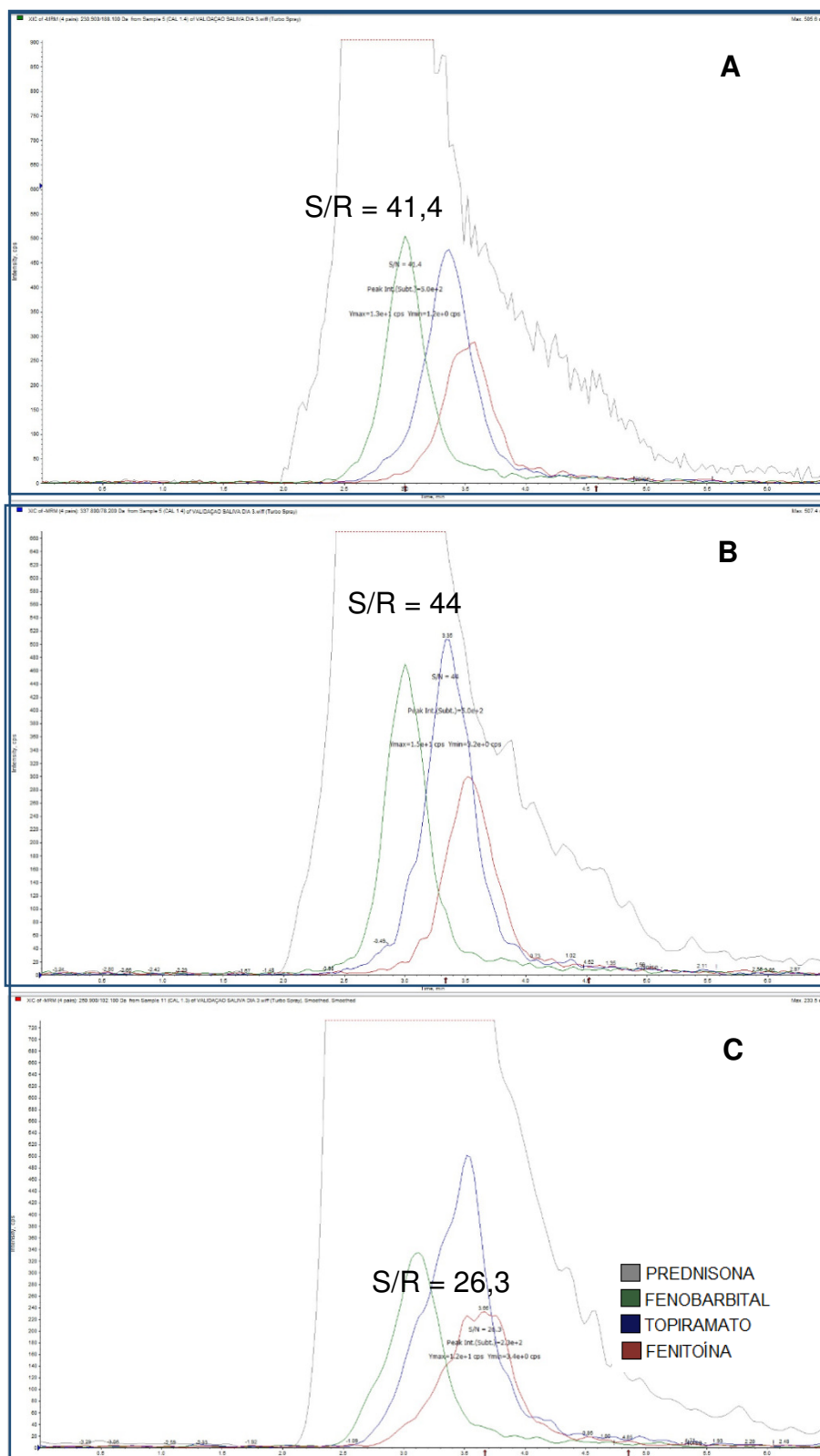


FIGURA 21: ESPECTROS OBTIDOS NO ENSAIO DE LID NA MATRIZ SALIVA COM AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO DE  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$  PARA A FENITOÍNA (A),  $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$  PARA O FENOBARBITAL (B) E DE  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$  PARA O TOPIRAMATO (C) EM SALIVA E SUAS RESPECTIVAS RELAÇÕES SINAL/RUÍDO (S/R).



#### 5.4.4 Efeito Matriz

O efeito matriz objetivou avaliar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz de plasma e saliva na ionização dos analitos de interesse, podendo provocar diminuição ou ampliação do sinal gerado.

O ensaio foi avaliado através da comparação dos resultados das áreas obtidas com matriz fortificada com aqueles obtidos em solução, nas mesmas concentrações. Para corrigir as variações do processo de extração, foi utilizado o Fator Matriz Normalizada por PI (FMN), cujo cálculo foi realizado conforme RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), descrito no item 4.8.2. Os resultados obtidos na matriz plasma estão dispostos na Tabela 8 e os obtidos na matriz saliva na Tabela 9.

TABELA 8– RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ EM PLASMA.

Controle	Analito	<sup>a</sup> FMN± DP	<sup>b</sup> CV (%)
CQB	Fenitoína	1,03 ± 0,08	7,4
	Fenobarbital	0,96 ± 0,05	5,4
	Topiramato	1,04 ± 0,07	7,2
CQA	Fenitoína	0,98 ± 0,03	3,4
	Fenobarbital	0,98 ± 0,05	4,7
	Topiramato	0,99 ± 0,04	4,5

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Razão entre resposta analito em matriz normalizado pelo PI e resposta do analito em solução também normalizado pelo PI; <sup>b</sup>Variação entre os FMNs;

TABELA 9 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ EM SALIVA.

Controle	Analito	<sup>a</sup> FMN± DP	<sup>b</sup> CV (%)
CQB	Fenitoína	1,66 ± 0,03	1,9
	Fenobarbital	1,50 ± 0,04	2,6
	Topiramato	1,69 ± 0,06	3,3
CQA	Fenitoína	1,68 ± 0,06	3,5
	Fenobarbital	1,47 ± 0,05	3,1
	Topiramato	1,67 ± 0,06	3,5

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Razão entre resposta analito em matriz normalizado pelo PI e resposta do analito em solução também normalizado pelo PI; <sup>b</sup> Variação entre os FMNs;

A concentração de PI (prednisona) adicionada nas amostras foi definida de forma a gerar um sinal compatível com o sinal gerado nas análises de CQM de todos os analitos, para que assim pudesse normalizar tanto as concentrações mais baixas quanto mais altas da curva analítica proposta. Nos testes iniciais de desenvolvimento se observou que em amostras analisadas em matriz saliva o sinal da prednisona (PI) era cerca de 50% menor que o sinal do mesmo composto em solução ou em plasma. Assim, optou-se por aumentar a concentração utilizada de PI nas análises realizadas em saliva, afim de que pudesse normalizar de maneira correta a concentração dos íons de maior concentração e intensidade. Utilizou-se uma concentração de prednisona (PI) de 300 ng mL<sup>-1</sup> nas análises de validação realizadas em plasma e de 600 ng mL<sup>-1</sup> nas análises de validação realizadas em saliva.

Pelos resultados apresentados no ensaio de efeito matriz pode se observar que quando a matriz analisada é plasma, a resposta obtida em solução e em matriz são equivalentes, não havendo interferência dos componentes endógenos do plasma na resposta esperada para os analitos. A utilização de uma pequena quantidade de amostra para realização das análises corrobora bastante para este resultado.

Já quando a matriz utilizada para as análises é saliva, observa-se um efeito matriz bastante significativo, com influência acima de 50% sobre a resposta esperada para os analitos. Conforme esperado, isso se deve a interferência de componentes salivares na ionização do PI (prednisona), que é o primeiro composto a eluir no processo de separação cromatográfico. Sais, como sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos, presentes na saliva que competem com o PI na fonte de ionização, reduzindo a formação de íons que chegam até os quadrupolos para análise. Porém, a resposta dos analitos é constante com variação entre as oito replicatas realizadas para cada controle menor que 5,0%.

Uma das formas de se evitar este tipo de interferência da matriz é alterar a cromatografia, aumentando o tempo de análise e a realização de limpeza de amostra, geralmente envolvendo o uso de cartuchos de extração por fase sólida (EICKHAUT *et al.*, 2009). Porém, como o objetivo é o desenvolvimento do método mais rápido, simples e barato possível para aplicação na rotina e os resultados do teste de efeito matriz se mostraram bastante reprodutíveis, com coeficiente de

variação bem abaixo dos 15% preconizados pela legislação, optou-se por manter o método em questão sem alterações.

Para padronização do método e uniformidade dos resultados é aconselhável apenas que as curvas de quantificação e pontos de controle utilizados nesse método sejam sempre feitos com adição de plasma e saliva branco, mantendo a mesma resposta tanto para amostras como pontos de calibração e controles.

#### 5.4.5 Linearidade

Um método analítico de qualidade deve apresentar uma relação linear entre a razão das áreas dos picos do analito/áreas dos picos do padrão interno *versus* a razão da concentração do analito/concentração do padrão interno.

As curvas analíticas foram desenvolvidas no método proposto de forma a detectar a menor concentração possível de analito na matriz, atendendo ao range de concentração esperada para cada analito nas diferentes matrizes, sem deixar de lado o alcance dos parâmetros mínimos de precisão e exatidão. Para a definição das concentrações para a construção da curva analítica procurou-se na literatura referências da concentração esperada de cada analito nas diferentes matrizes, a fim de traçar um range de linearidade que atendesse a concentração a ser encontrada em cada paciente, e pudesse detectar os fármacos nos momentos iniciais de administração (TABELA 10).

Os resultados disponíveis na literatura para a matriz saliva correspondem a resultados obtidos por outras técnicas, como FPIA para análise de topiramato (MILES et al., 2003) e fenitoína (ZAABI, 2003) e Cromatografia Gasosa para análise de fenobarbital (SCHMIDT; KUPFERBERG, 2007), porém, fornecem concentrações aproximadas, mas que são úteis para o desenho de uma curva analítica.

Como os valores relacionados com a concentração plasmática de anticonvulsivantes em plasma também já são bem estabelecidos pela literatura, utilizando a técnica de CLAE-EM/EM para os três analitos de interesse, foi possível definir uma curva com as concentrações de analitos para análises de fenitoína, fenobarbital e topiramato em plasma e transpor para a matriz saliva, apenas modificando-se a concentração de padrão interno, conforme resultados discutidos no ensaio de efeito matriz. Isso corrobora para que se tenha uma maior padronização

dos ensaios e auxilie na execução das análises, evitando que os analistas de laboratório tenham que trabalhar com soluções intermediárias de diversas concentrações e realizar diluições variadas para cada matriz a ser analisada.

TABELA 10: COMPARAÇÃO ENTRE RANGES DE CONCENTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE ANTICONVULSIVANTES EM PLASMA E SALIVA

Analito	<sup>a</sup> Concentração em Solução Método Desenvolvido (ngmL <sup>-1</sup> )	<sup>b</sup> Concentração em matriz de Plasma ou Saliva método desenvolvido (µgmL <sup>-1</sup> )	<sup>c</sup> Concentração Plasmática esperada (µgmL <sup>-1</sup> )	<sup>d</sup> Concentração salivar esperada (µgmL <sup>-1</sup> )
Fenitoína	5 - 500	0,25- 22,5	3,0 - 20,0	Aprox. 4,00
Fenobarbital	50 - 2000	2,5 - 100	10,0 - 40,0	Aprox. 7,00
Topiramato	2,5 - 300	0,125 - 12,5	0,9 - 9,7	2,3 - 11,60

NOTA: <sup>a</sup> Segundo dados de linearidade do trabalho em solução; <sup>b</sup> Segundo dados de linearidade do trabalho em matriz de plasma e saliva; <sup>c</sup>(KIM *et al.*, 2011); <sup>d</sup> Dados fenitoína (ZAABI,2003); Dados fenobarbital (Schmidt; Kupferberg, 2007); Dados Topiramato (MILES *et al.*, 2003).

Conseguiu-se durante os três dias de ensaio de linearidade provar a confiabilidade do método tanto na matriz de plasma quanto de saliva. Observou-se coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99 tanto para plasma (FIGURAS 22 a 30) como para saliva (FIGURAS 31, 39) para os três analitos de interesse: fenitoína, fenobarbital e topiramato. Isso comprova uma correlação proporcional entre a concentração do analito e o sinal detectado pelo método, o que indica um grau alto grau de confiabilidade nos doseamentos a serem realizados a partir de matrizes de plasma e saliva por este método.

Além disso, também se obteve uma ótima precisão entre as análises para todos os fármacos nas matrizes estudadas, com o coeficiente de variação entre 0,9% e 7,5% para as análises em plasma (TABELA 11, 12 e 13) e entre 1,4% e 8,7% para as análises em saliva (TABELA 14,15 e 16). Outro fator que corrobora com a confiabilidade esperada para o método é a excelente exatidão apresentada durante o ensaio de linearidade, onde os valores variaram no máximo 10,4% para as análises em plasma e de 11,8% para as análises em saliva. Considera-se o método validado, uma vez que a variação entre as amostras e exatidão do método é menor que 15% (BRASIL, 2012).

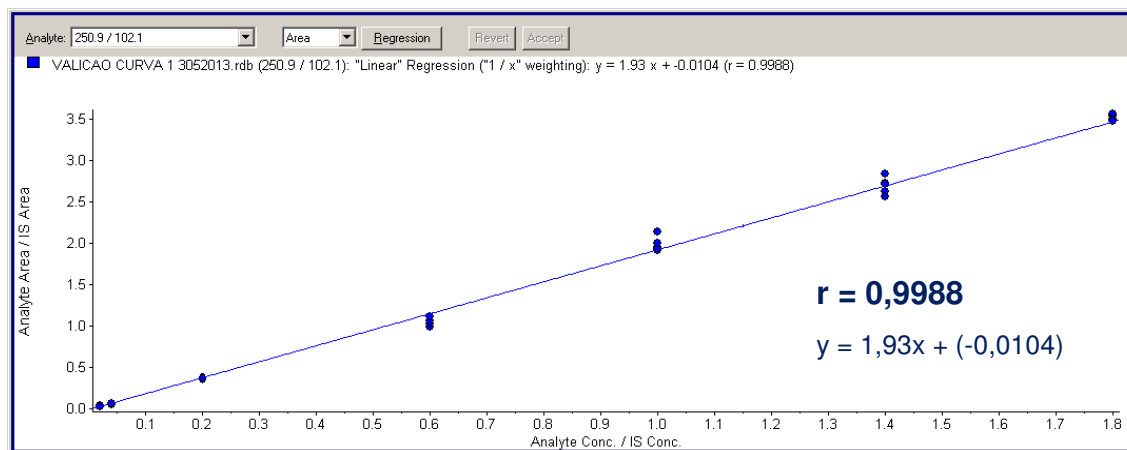


FIGURA 22: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM PLASMA, DIA 1

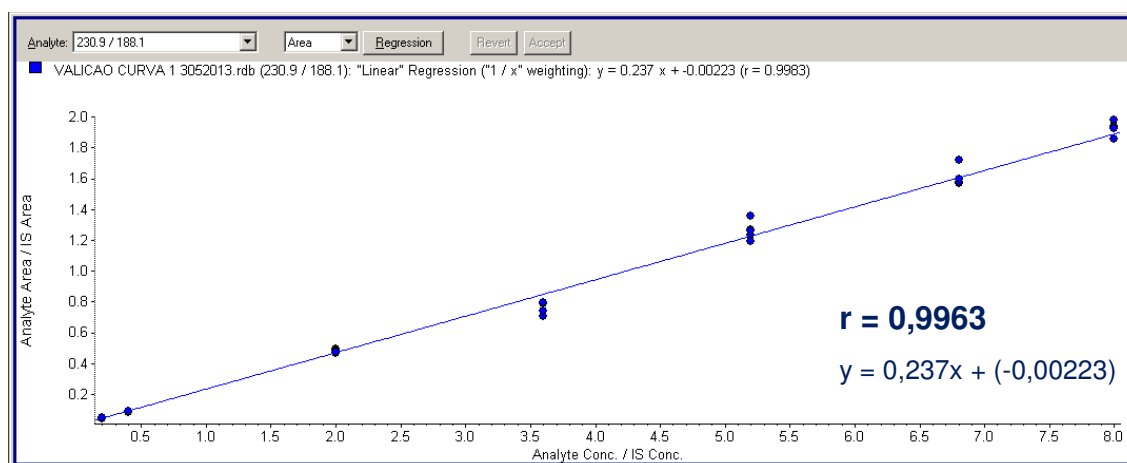


FIGURA 23: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM PLASMA, DIA 1

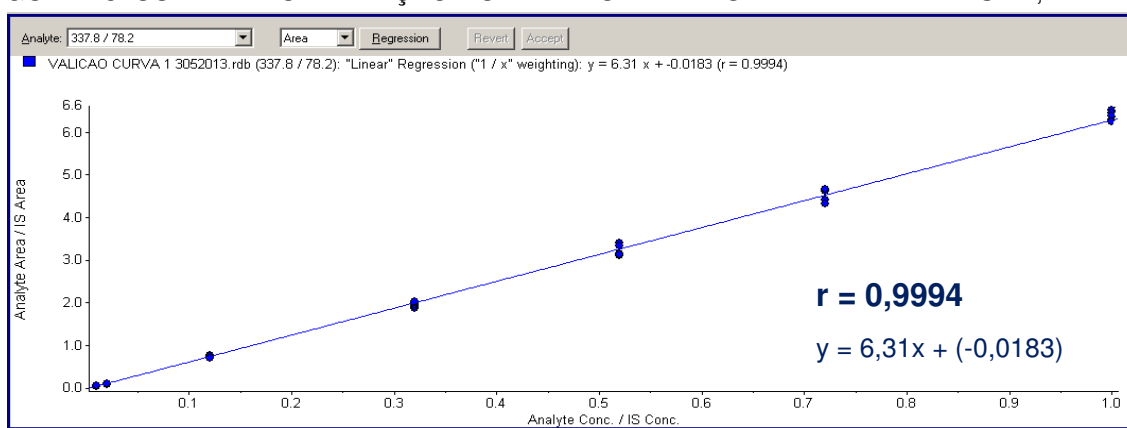


FIGURA 24: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM PLASMA, DIA 1

TABELA 11: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 1

Nível	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ng mL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR(%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,5 ± 0,2	3,90	10,4
	Fenobarbital	50	52,9 ± 1,8	3,46	5,8
	Topiramato	2,5	2,7 ± 0,1	3,52	7,3
2	Fenitoína	10	9,1 ± 0,5	5,89	9,0
	Fenobarbital	100	95,9 ± 3,4	3,56	4,1
	Topiramato	5	4,5 ± 0,3	7,49	10,4
3	Fenitoína	50	47,7 ± 0,9	1,96	4,6
	Fenobarbital	500	509,0 ± 12,6	2,47	1,8
	Topiramato	30	30,0 ± 1,0	3,26	0,3
4	Fenitoína	150	138,8 ± 7,3	5,23	7,5
	Fenobarbital	900	811,0 ± 39,9	4,92	9,9
	Topiramato	80	78,3 ± 2,7	3,48	2,1
5	Fenitoína	250	258,6 ± 11,2	4,33	3,4
	Fenobarbital	1300	1338,0 ± 65,7	4,91	2,9
	Topiramato	130	128,8 ± 5,4	4,16	0,9
6	Fenitoína	350	349,6 ± 13,5	3,87	0,1
	Fenobarbital	1700	1706,0 ± 65,0	3,81	0,4
	Topiramato	180	178,2 ± 6,4	3,60	1,0
7 (LSQ)	Fenitoína	450	455,6 ± 4,7	1,02	1,2
	Fenobarbital	2000	2036,0 ± 43,4	2,13	1,8
	Topiramato	250	254,2 ± 4,3	1,70	1,7

NOTA: n= 5; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica

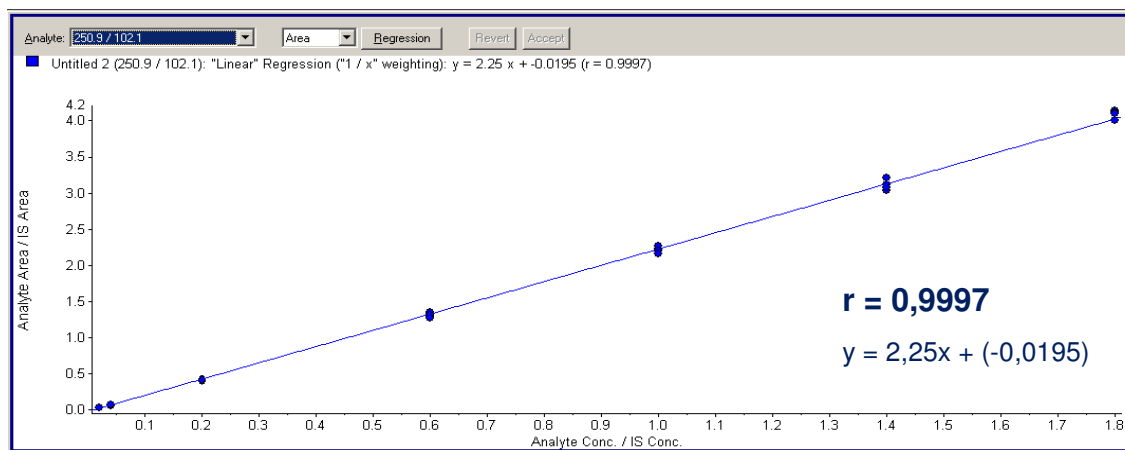


FIGURA 25: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM PLASMA, DIA 2

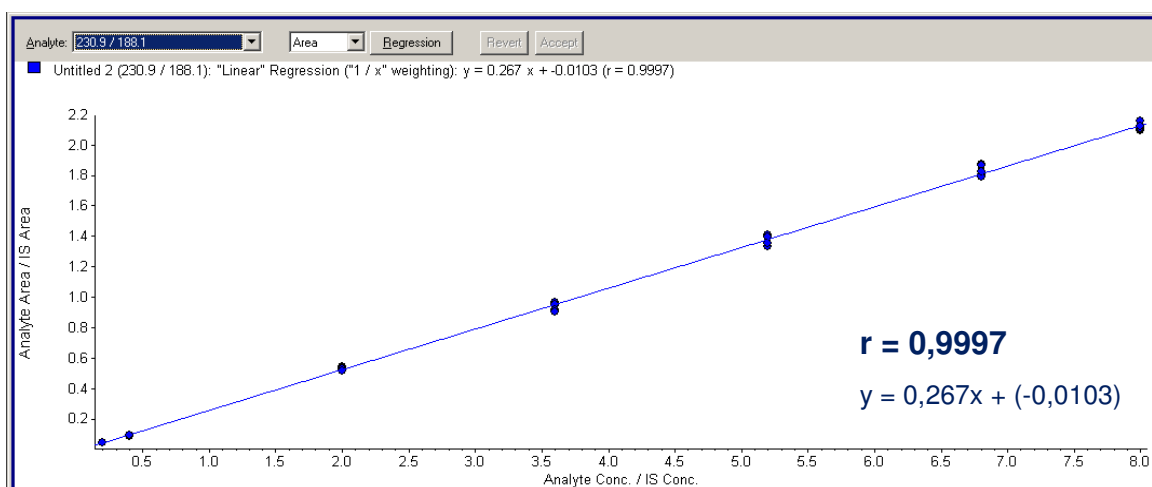


FIGURA 26: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITL EM PLASMA, DIA 2

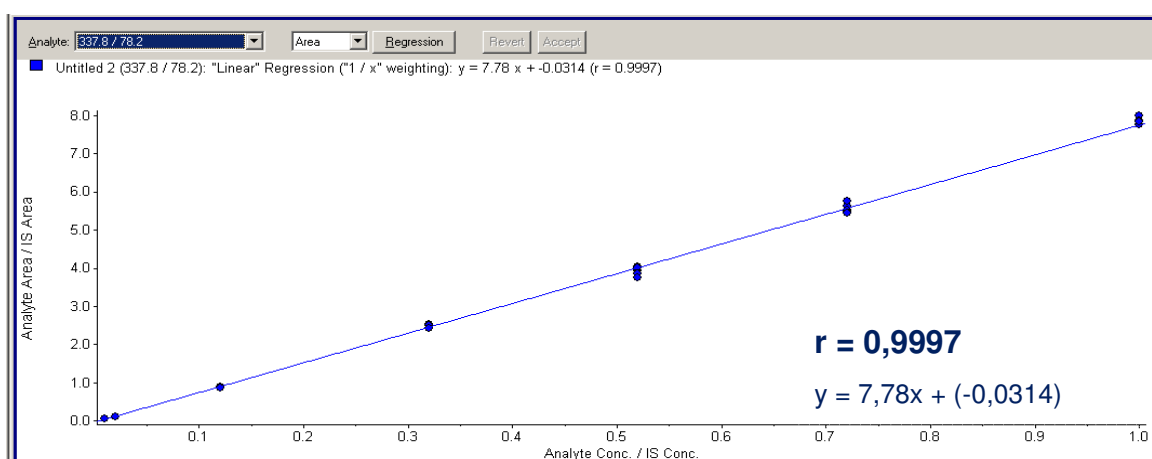


FIGURA 27: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM PLASMA, DIA 2

TABELA 12: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 2

Nível	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ng mL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,3 ± 0,2	4,00	6,4
	Fenobarbital	50	51,5 ± 2,4	4,56	3,8
	Topiramato	2,5	2,6 ± 0,1	2,41	5,4
2	Fenitoína	10	9,5 ± 0,3	2,77	4,9
	Fenobarbital	100	94,9 ± 1,4	1,43	5,1
	Topiramato	5	4,7 ± 0,1	1,23	5,3
3	Fenitoína	50	47,7 ± 1,2	2,61	4,6
	Fenobarbital	500	507,8 ± 10,1	1,99	1,6
	Topiramato	30	29,2 ± 0,5	1,56	2,8
4	Fenitoína	150	147,8 ± 3,9	2,68	1,5
	Fenobarbital	900	894,3 ± 17,9	2,00	0,6
	Topiramato	80	80,2 ± 1,7	2,12	0,3
5	Fenitoína	250	249,8 ± 5,2	2,09	0,8
	Fenobarbital	1300	1307,5 ± 32,0	2,45	0,6
	Topiramato	130	127,2 ± 3,7	2,91	2,2
6	Fenitoína	350	347,4 ± 7,2	2,08	0,7
	Fenobarbital	1700	1725,0 ± 41,2	2,39	1,5
	Topiramato	180	179,8 ± 3,9	2,20	0,1
7 (LSQ)	Fenitoína	450	457,4 ± 5,6	1,22	1,6
	Fenobarbital	2000	1990,0 ± 27,1	1,36	0,5
	Topiramato	250	253,8 ± 2,6	1,02	1,5

NOTA: n= 5; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.



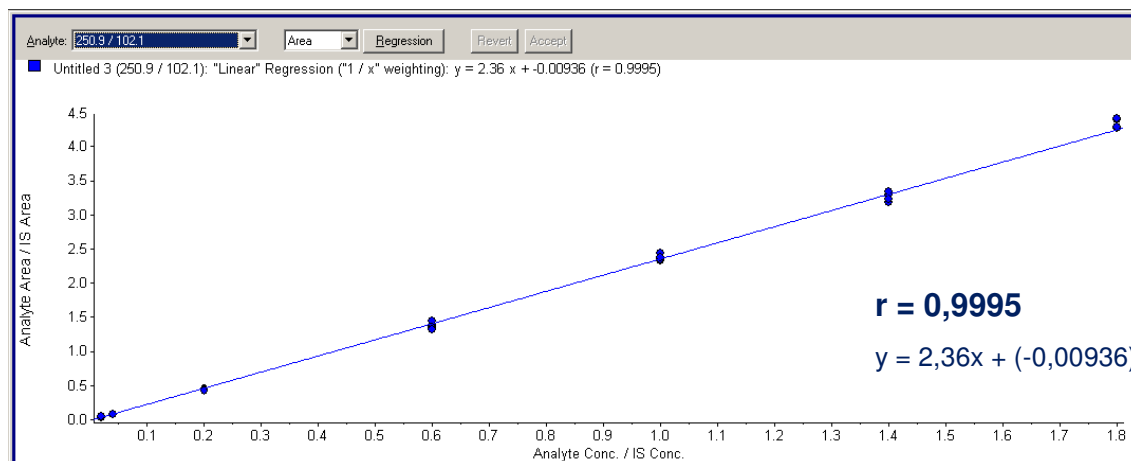


FIGURA 28: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM PLASMA, DIA 3

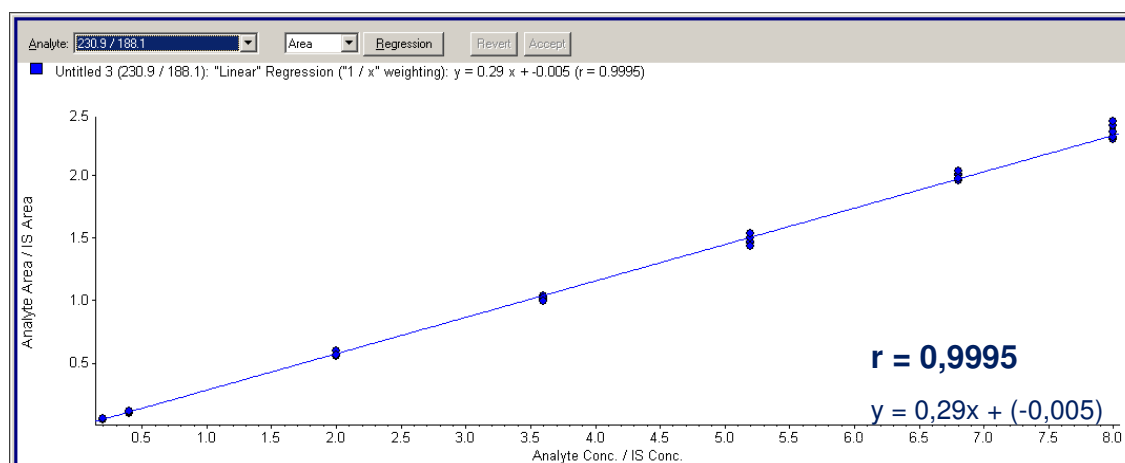


FIGURA 29: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO FENOBARBITAL EM PLASMA, DIA 3

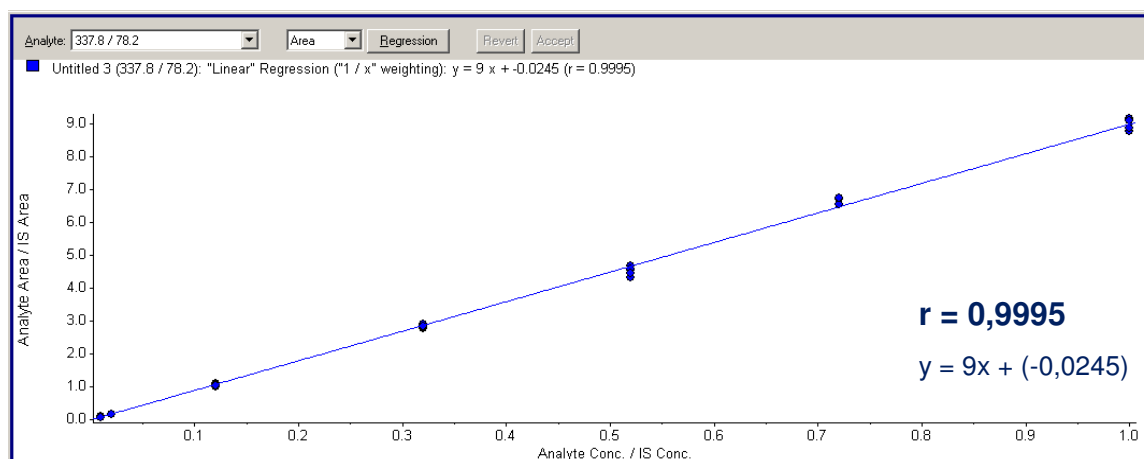


FIGURA 30: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM PLASMA, DIA 3

TABELA 13: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZPLASMA, DIA 3

Nível	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ng mL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR(%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,5 ± 0,2	3,38	9,6
	Fenobarbital	50	51,5 ± 2,5	4,81	3,0
	Topiramato	2,5	2,6 ± 0,1	2,43	4,8
2	Fenitoína	10	9,3 ± 0,1	0,91	7,2
	Fenobarbital	100	96,7 ± 3,9	4,12	3,3
	Topiramato	5	4,8 ± 0,2	3,83	4,8
3	Fenitoína	50	46,4 ± 1,3	2,81	7,3
	Fenobarbital	500	499,4 ± 17,7	3,55	0,1
	Topiramato	30	29,5 ± 1,0	3,26	1,8
4	Fenitoína	150	145,8 ± 5,4	3,71	2,8
	Fenobarbital	900	872,8 ± 19,6	2,25	3,0
	Topiramato	80	79,3 ± 1,6	1,99	0,8
5	Fenitoína	250	251,4 ± 4,2	1,65	0,6
	Fenobarbital	1300	1278,0 ± 31,9	2,50	1,7
	Topiramato	130	126,0 ± 52,9	3,74	3,1
6	Fenitoína	350	347,4 ± 6,8	1,96	0,8
	Fenobarbital	1700	1720,0 ± 24,5	1,42	1,2
	Topiramato	180	185,2 ± 3,0	1,59	2,9
7 (LSQ)	Fenitoína	450	458,8 ± 6,2	1,35	2,0
	Fenobarbital	2000	2030,0 ± 51,0	2,51	1,5
	Topiramato	250	250,2 ± 4,4	1,77	0,1

NOTA: n= 5; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

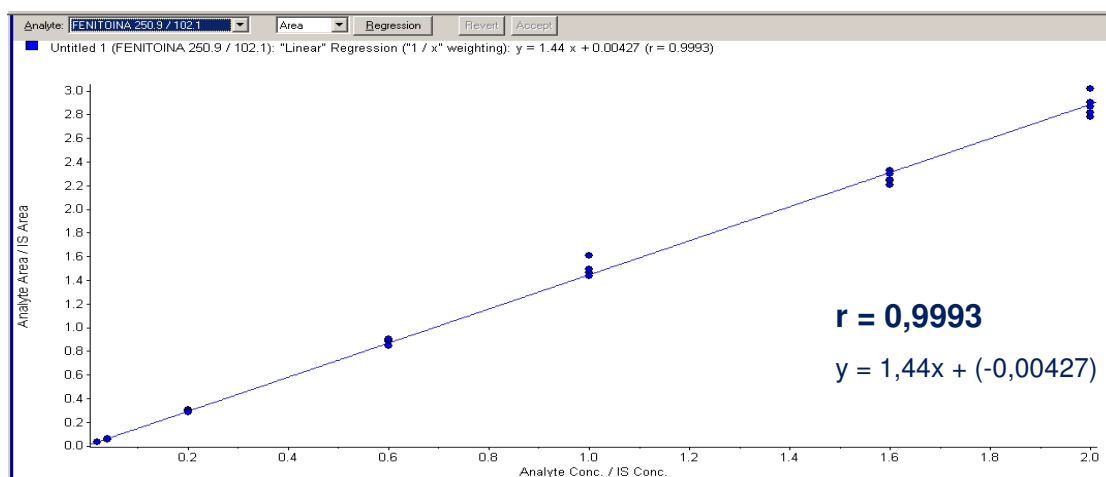


FIGURA 31: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM SALIVA, DIA 1

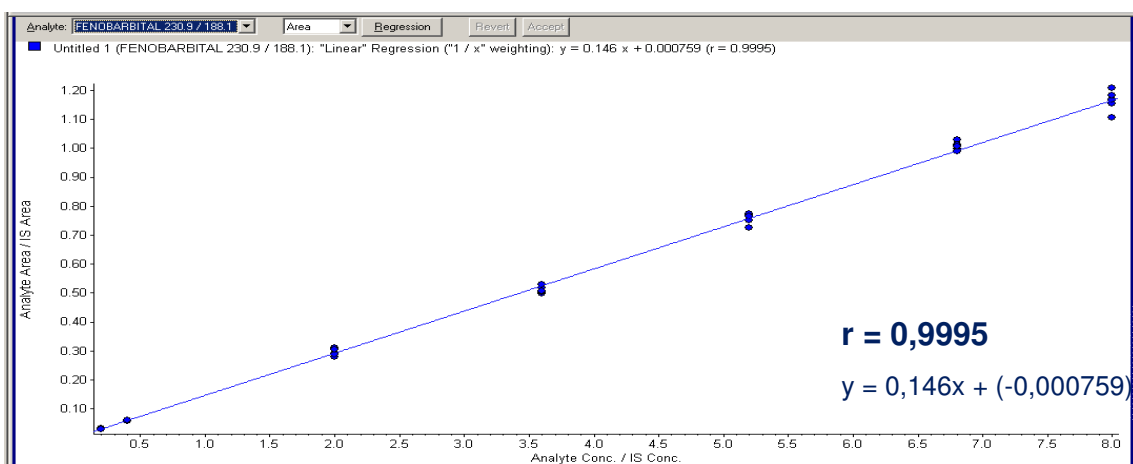


FIGURA 32: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM SALIVA, DIA 1

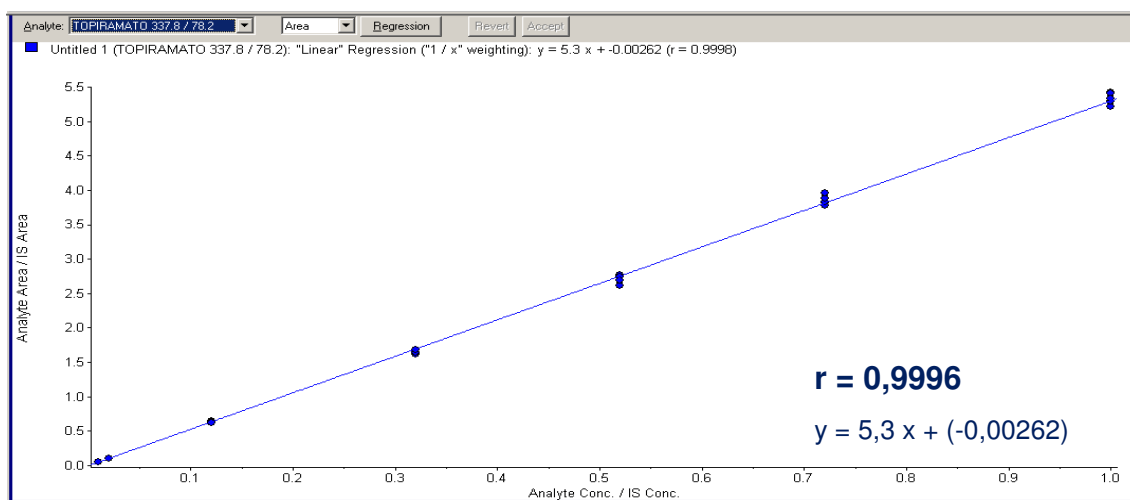


FIGURA 33: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM SALIVA, DIA 1

TABELA 14: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZSALIVA, DIA 1

Nível	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ng mL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,1 ± 0,2	3,10	1,1
	Fenobarbital	50	50,5 ± 1,4	2,73	1,0
	Topiramato	2,5	2,5 ± 0,1	2,39	1,0
2	Fenitoína	10	9,6 ± 0,7	6,97	3,6
	Fenobarbital	100	98,9 ± 2,9	2,96	1,1
	Topiramato	5	5,0 ± 0,2	3,60	0,2
3	Fenitoína	50	49,9 ± 1,4	2,86	0,2
	Fenobarbital	500	504,4 ± 21,9	4,34	0,9
	Topiramato	30	30,0 ± 0,5	1,77	0,1
4	Fenitoína	150	151,0 ± 4,8	3,17	0,7
	Fenobarbital	900	876,2 ± 21,5	2,46	2,7
	Topiramato	80	78,1 ± 1,3	1,69	2,4
5	Fenitoína	250	259,0 ± 11,0	4,40	3,6
	Fenobarbital	1300	1300,0 ± 31,6	2,43	0,0
	Topiramato	130	128,2 ± 2,8	2,16	1,4
6	Fenitoína	350	391,8 ± 8,70	2,22	11,9
	Fenobarbital	1700	1726 ± 24,08	1,40	1,5
	Topiramato	180	182 ± 3,53	1,94	1,1
7 (LSQ)	Fenitoína	450	498,2 ± 15,81	3,17	10,7
	Fenobarbital	2000	1996 ± 63,48	3,18	0,2
	Topiramato	250	251,8 ± 4,02	1,60	0,7

NOTA: n= 5; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

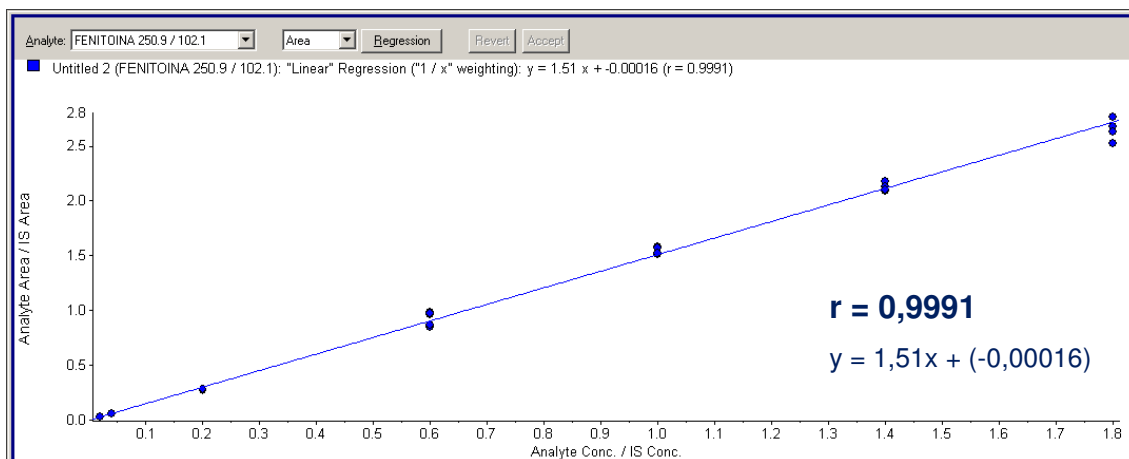


FIGURA 34: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DEFENITOÍNA EM SALIVA, DIA 2

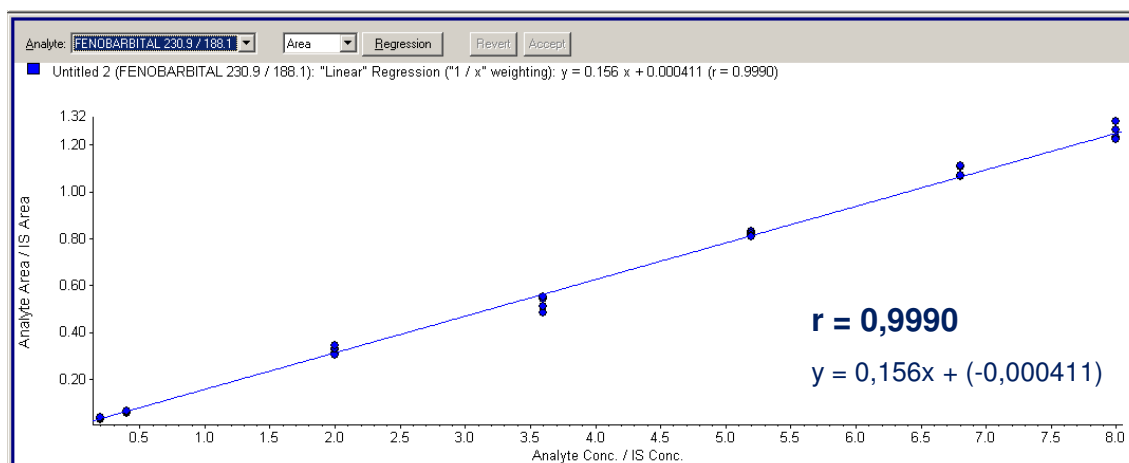


FIGURA 35: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DEFENOBARBITAL EM SALIVA, DIA 2

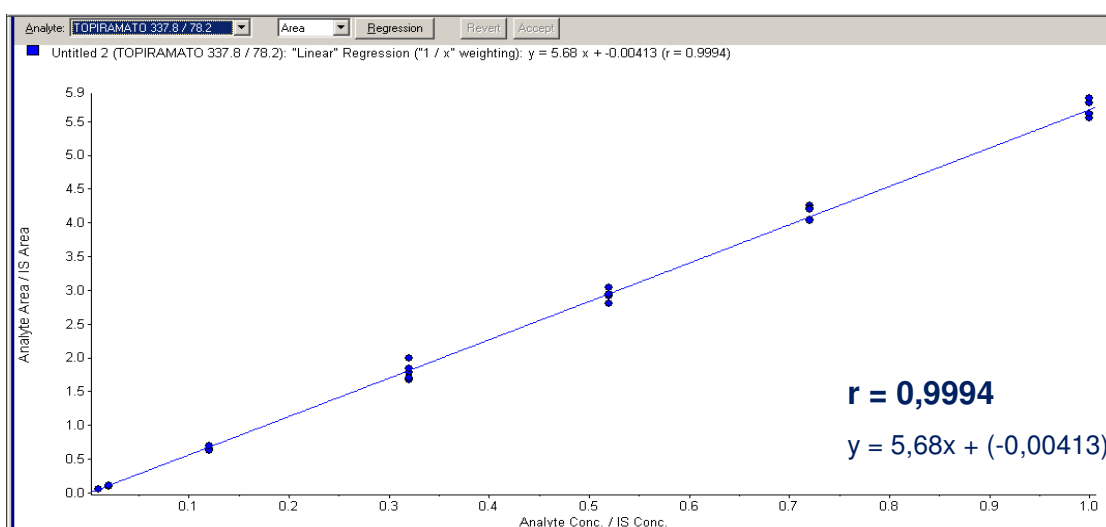


FIGURA 36: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DETOPIRAMATO EM SALIVA, DIA 2

TABELA 15: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZSALIVA, DIA 2

Nível	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ng mL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,4 ± 0,4	7,23	9,2
	Fenobarbital	50	53,2 ± 2,9	5,42	6,4
	Topiramato	2,5	2,7 ± 0,1	2,91	7,2
2	Fenitoína	10	9,1 ± 0,3	3,11	9,5
	Fenobarbital	100	91,8 ± 3,7	4,07	8,2
	Topiramato	5	4,8 ± 0,1	2,14	5,1
3	Fenitoína	50	44,7 ± 2,0	4,44	10,5
	Fenobarbital	500	490,5 ± 16,4	3,35	2,9
	Topiramato	30	28,3 ± 1,8	6,36	5,5
4	Fenitoína	150	147,4 ± 8,4	5,71	1,7
	Fenobarbital	900	823,5 ± 56,4	6,85	8,5
	Topiramato	80	78,4 ± 3,4	4,38	1,9
5	Fenitoína	250	279,4 ± 3,6	1,28	11,7
	Fenobarbital	1300	1327,5 ± 37,8	2,84	2,1
	Topiramato	130	128,4 ± 2,3	1,79	1,2
6	Fenitoína	350	350,2 ± 11,3	3,24	0,1
	Fenobarbital	1700	1762,5 ± 91,1	5,17	3,7
	Topiramato	180	182,0 ± 10,4	5,74	1,1
7 (LSQ)	Fenitoína	450	428,2 ± 17,0	4,02	4,8
	Fenobarbital	2000	1977,5 ± 100,546	5,08	1,1
	Topiramato	250	252,6 ± 12,2	4,96	1,0

NOTA: n= 5; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

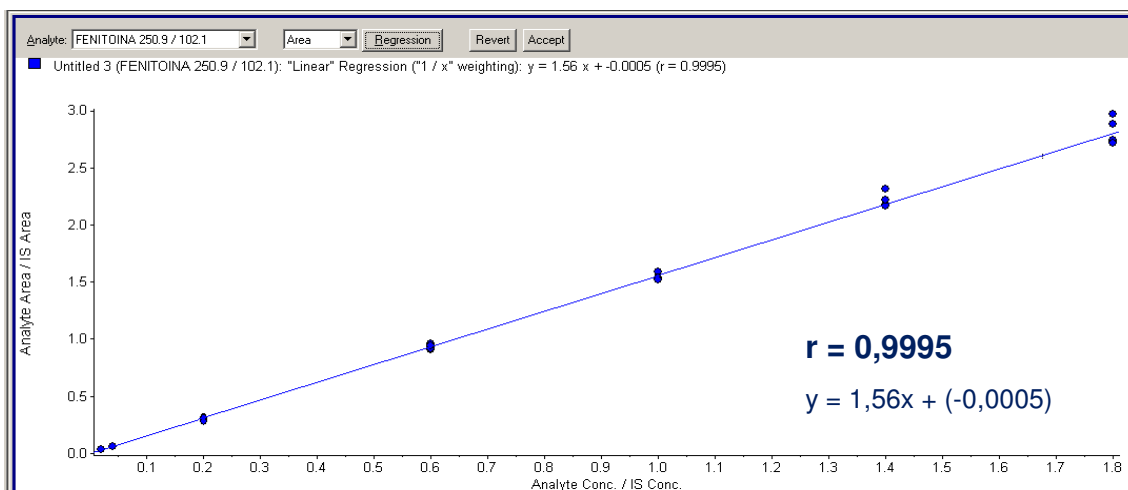


FIGURA 37: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENITOÍNA EM SALIVA, DIA 3

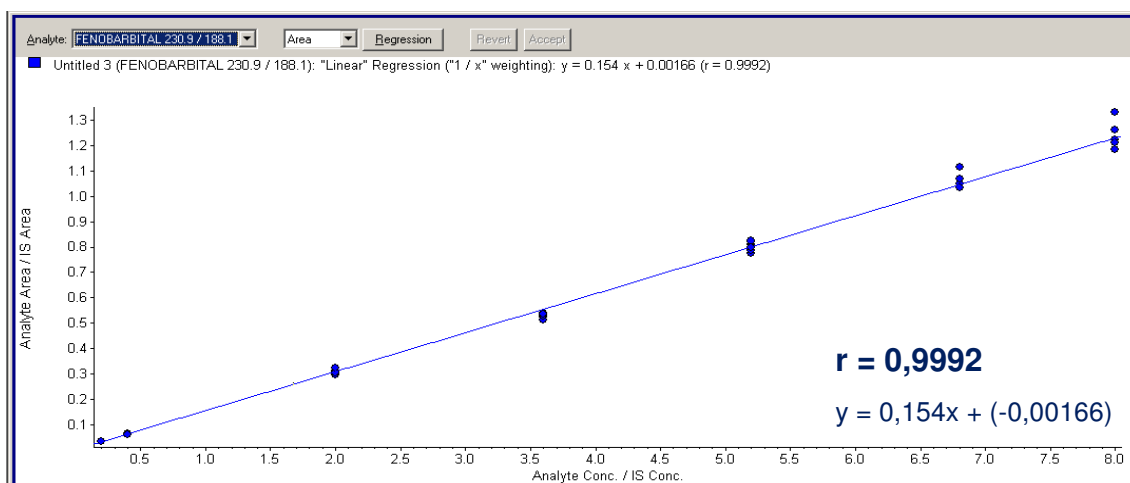


FIGURA 38: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FENOBARBITAL EM SALIVA, DIA 3

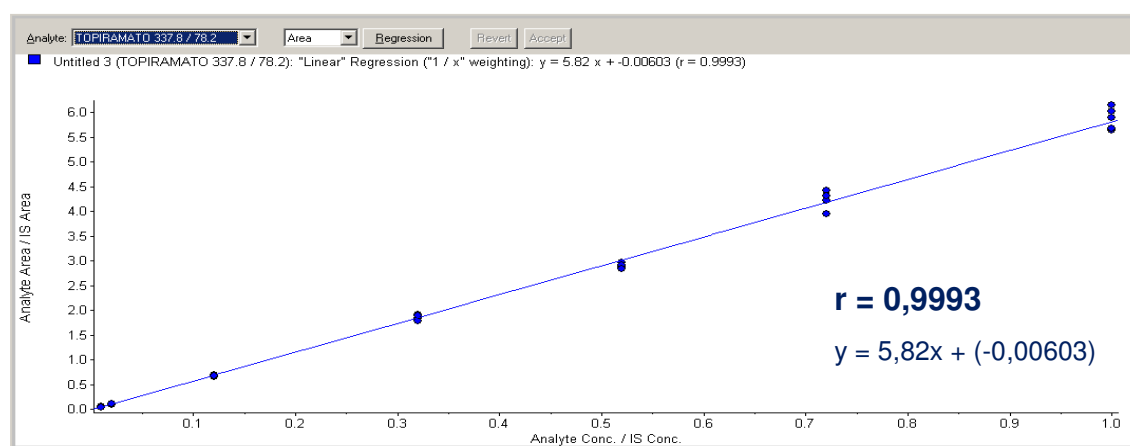


FIGURA 39: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TOPIRAMATO EM SALIVA, DIA 3

TABELA 16: ANÁLISE DE LINEARIDADE UTILIZANDO MATRIZSALIVA, DIA 3

Nível	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ng mL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,4 ± 0,4	8,65	2,8
	Fenobarbital	50	51,2 ± 2,0	3,81	2,4
	Topiramato	2,5	2,6 ± 0,1	3,90	2,3
2	Fenitoína	10	10,0 ± 0,4	3,54	0,5
	Fenobarbital	100	98,9 ± 2,3	2,37	1,1
	Topiramato	5	4,9 ± 0,1	1,98	1,2
3	Fenitoína	50	48,0 ± 2,0	4,21	3,9
	Fenobarbital	500	499,8 ± 15,6	3,12	0,1
	Topiramato	30	29,6 ± 0,4	1,35	1,3
4	Fenitoína	150	149,4 ± 3,2	2,15	0,4
	Fenobarbital	900	856,2 ± 15,6	1,82	4,9
	Topiramato	80	80,5 ± 2,3	2,86	0,6
5	Fenitoína	250	247,2 ± 4,6	1,84	1,1
	Fenobarbital	1300	1296,0 ± 30,5	2,35	0,3
	Topiramato	130	124,6 ± 2,4	1,93	4,1
6	Fenitoína	350	354,0 ± 10,8	3,04	1,1
	Fenobarbital	1700	1728,0 ± 49,2	2,85	1,6
	Topiramato	180	182,6 ± 7,6	4,16	1,4
7 (LSQ)	Fenitoína	450	451,0 ± 18,1	4,02	0,2
	Fenobarbital	2000	2020,0 ± 95,9	4,75	1,0
	Topiramato	250	252,6 ± 9,2	3,63	1,0

NOTA: n= 5; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

Os estudos práticos envolvendo o doseamento de fenitoína, fenobarbital e topiramato em saliva, são realizados nos fármacos isolados, sendo que os dados disponíveis foram obtidos a partir de técnicas de IFPA (ZAABI,2003; MILES et al., 2003) ou cromatografia gasosa (SCHMIDT; KUPFERBERG, 2007), o que faz com



que seja difícil estabelecer um comparativo entre a linearidade e range do método nesta matriz em relação com métodos já disponíveis.

Sabe-se, no entanto, que o limite de quantificação mínimo para as técnicas já estudadas é de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que no caso do fenobarbital se chega a gastar 10 mL de amostra para realização de cada análise (SCHMIDT; KUPFERBERG, 2007). Assim, o range alcançado para análise tanto de fenitoína, quanto fenobarbital e topiramato em amostras de saliva e plasma (TABELA 10), utilizando uma tomada de amostra mínima, com precisão e exatidão comprovados faz com que o método tenha uma aplicação bastante interessante na rotina analítica de monitoramento terapêutico, conseguindo detectar o fármaco em concentrações bastante baixas típicas dos primeiros minutos após administração dos medicamentos sem que haja desconforto dos pacientes no decorrer das coletas.

Já a análise de anticonvulsivantes em plasma já foi melhor explorada pelo meio científico, com dados disponíveis com o uso de CLAE-EM/EM envolvendo o estudo de até nove anticonvulsivantes, incluindo a fenitoína, o fenobarbital e o topiramato, porém, utilizam-se de concentrações maiores de plasma, cerca de 100  $\mu\text{L}$ , e fazem uso de cartuchos de SPE (KIM *et al.*, 2011) para limpeza da amostra, afim de reduzir o efeito matriz proveniente de componentes do plasma que possa influenciar na ionização dos analitos de interesse. Porém, pensando em monitoramento terapêutico, em que são necessárias várias análises em diferentes tempos para cada paciente e o desenvolvimento de um método único para análise de anticonvulsivantes tanto em plasma quanto em saliva, a utilização de métodos como este torna-se inviável. Primeiramente por causa do custo envolvido, uma vez que os cartuchos de SPE são bastante caros. Também temos o fator tempo, pois a introdução de um passo de limpeza da amostra eleva o tempo de preparo em mais de 50%. Depois pela quantidade necessária de amostra, pois são necessárias no mínimo três análises de cada tempo de coleta para se ter um resultado representativo e confiável da análise, e no caso da saliva quanto menor o volume necessário de amostra melhor para o paciente, uma vez que não será necessária a utilização de métodos de estímulo de produção salivar, como por exemplo, com suco de limão ou ácido cítrico.

O range de quantificação de método desenvolvido se mostra com um limite de detecção inferior há literatura para análises de topiramato e fenitoína em plasma (TABELA 17), o que pode auxiliar na quantificação dos ativos nos momentos iniciais

de administração possibilitando a melhor definição das curvas de absorção dos fármacos analisados.

TABELA 17: COMPARAÇÃO ENTRE LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO COMPROVADOS PELA LINEARIDADE DO MÉTODO DESENVOLVIDO E MÉTODO DISPONÍVEL NA LITERATURA.

Analito	<sup>a</sup> Concentração em matriz método desenvolvido ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<sup>b</sup> Concentração em matriz de plasma método literatura ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Fenitoína	0,250	0,500
Fenobarbital	2,500	0,500
Topiramato	0,125	0,375

NOTA: <sup>a</sup> Segundo dados de linearidade do trabalho; <sup>b</sup>(KIM *et al.*, 2011);

#### 5.4.6 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão objetivou avaliar a proximidade de resultados de análises realizadas em uma mesma amostra. No ensaio de validação ela foi avaliada através do coeficiente de variação entre replicatas de controles de qualidade da curva de calibração, sendo avaliadas oito replicatas de cada controle em três dias consecutivos.

Nos três dias de ensaios realizados foi observada uma excelente precisão para os três analitos, bastante semelhante ao observado durante as análises de linearidade, com um coeficiente de variação intracorrída máximo de 5,83% para as análises em plasma (TABELAS18,19 e 20) e de 8,65% para as análises de saliva (TABELAS21, 22 e 23). Já quando se avaliam resultados obtidos em todas as corridas realizadas em dias diferentes, têm-se uma precisão intercorrída máxima de 4,83% para os controles analisados em plasma (TABELA 24) e de 8,65% para os controles em saliva (TABELA 25). Os resultados são bastante satisfatórios visto que trata-se de um mesmo método sendo aplicado para diferentes matrizes.

A exatidão, por sua vez, demonstrou a concordância entre o valor real do analito na amostra e o valor obtido através do método analítico desenvolvido. Assim, como a precisão, a exatidão do método também foi avaliada durante três dias

consecutivos através de resultados obtidos de oito replicatas de cada nível de controle de qualidade da curva de calibração do método. Porém, a exatidão é calculada em relação ao valor teórico esperado para cada nível. Os valores de exatidão intracorridas também foram bastante expressivos, variando no máximo 10,4% para os analitos avaliados em plasma (TABELA 18, 19 e 20) e de no máximo 12,7% para os analitos avaliados em saliva (TABELA 21, 22 e 23). Já quando avaliados os resultados gerais nos três dias de ensaio, têm-se uma exatidão intercorrida máxima de 8,8% para fenitoína, fenobarbital e topiramato em plasma (TABELA 24) e de 5,3% para os analitos em saliva (TABELA 25).

Como a resolução RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 propõe que no ensaio de precisão não se tenha um coeficiente de variação superior a 15% e um desvio máximo de 15% dos controles em relação aos seus valores nominais, pode-se considerar que o método desenvolvido cumpre as exigências mínimas de precisão e exatidão necessária para comprovar a confiabilidade do método.

TABELA 18: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 1

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,5 ± 0,2	3,9	10,4
	Fenobarbital	50	52,9 ± 1,8	3,46	5,8
	Topiramato	2,5	2,7 ± 0,1	3,52	7,3
CQB	Fenitoína	15	14,7 ± 0,5	3,33	1,9
	Fenobarbital	150	148,1 ± 5,9	4,01	1,2
	Topiramato	10	9,4 ± 0,6	5,83	6,5
CQM	Fenitoína	200	202,9 ± 9,0	4,45	1,4
	Fenobarbital	1200	1222,5 ± 54,218	4,43	1,9
	Topiramato	90	87,7 ± 4,435	4,96	2,5
CQA	Fenitoína	400	393,5 ± 6,4	1,61	1,6
	Fenobarbital	1800	1792,5 ± 24,9	1,39	0,4
	Topiramato	230	228,3 ± 3,8	1,65	0,8
CQD	Fenitoína	200	204,4 ± 11,4	5,59	2,2
	Fenobarbital	1200	1241,3 ± 72,4	5,83	3,4
	Topiramato	90	89,6 ± 6,3	7,00	0,5

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

TABELA 19: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 2

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR(%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,3 ± 0,2	4,09	6,4
	Fenobarbital	50	51,5 ± 2,4	4,56	3,8
	Topiramato	2,5	2,6 ± 0,1	2,41	5,4
CQB	Fenitoína	15	14,5 ± 0,6	3,99	3,2
	Fenobarbital	150	148,4 ± 6,2	4,19	1,5
	Topiramato	10	9,5 ± 0,4	4,09	5,2
CQM	Fenitoína	200	202,0 ± 4,5	2,21	1,0
	Fenobarbital	1200	1230,0 ± 20,0	1,63	2,5
	Topiramato	90	90,6 ± 2,2	2,47	0,7
CQA	Fenitoína	400	399,4 ± 6,0	1,50	0,2
	Fenobarbital	1800	178,0 ± 29,4	1,65	1,1
	Topiramato	230	230,5 ± 4,4	1,90	0,2
CQD	Fenitoína	200	198,8 ± 2,9	1,44	0,6
	Fenobarbital	1200	1220,0 ± 11,6	0,95	1,7
	Topiramato	90	89,0 ± 1,9	2,09	1,1

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

TABELA 20: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ PLASMA, DIA 3

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,5 ± 0,2	3,38	9,6
	Fenobarbital	50	51,5 ± 2,5	4,81	3,0
	Topiramato	2,5	2,6 ± 0,1	2,43	4,8
CQB	Fenitoína	15	15,1 ± 0,7	4,47	0,4
	Fenobarbital	150	147,8 ± 7,4	5,37	1,5
	Topiramato	10	9,3 ± 0,5	4,97	7,3
CQM	Fenitoína	200	197,6 ± 3,5	1,77	1,2
	Fenobarbital	1200	1170,0 ± 12,6	1,08	2,5
	Topiramato	90	85,1 ± 2,1	2,4	5,4
CQA	Fenitoína	400	408,9 ± 6,4	1,58	2,2
	Fenobarbital	1800	1851,4 ± 22,2	1,19	2,9
	Topiramato	230	232,3 ± 2,6	1,10	1,0
CQD	Fenitoína	200	210,4 ± 2,0	0,93	5,2
	Fenobarbital	1200	1197,5 ± 5,0	0,42	0,2
	Topiramato	90	86,4 ± 1,9	2,24	4,0

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.

TABELA 21: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 1

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,1 ± 0,2	3,10	1,1
	Fenobarbital	50	50,5 ± 1,4	2,73	1,1
	Topiramato	2,5	2,5 ± 0,1	2,39	1,1
CQB	Fenitoína	15	15,0 ± 0,6	3,69	0,2
	Fenobarbital	150	150,3 ± 3,5	2,33	0,2
	Topiramato	10	9,9 ± 0,4	3,76	1,2
CQM	Fenitoína	200	204,3 ± 3,1	1,52	2,1
	Fenobarbital	1200	1230,0 ± 28,8	2,34	2,5
	Topiramato	90	90,0 ± 2,8	3,08	0,0
CQA	Fenitoína	400	447,3 ± 10,765	2,38	11,8
	Fenobarbital	1800	1841,3 ± 46,4	2,52	2,3
	Topiramato	230	235,5 ± 6,1	2,60	2,4
CQD	Fenitoína	200	204,4 ± 11,4	5,59	2,2
	Fenobarbital	1200	1231,3 ± 58,4	4,74	2,6
	Topiramato	90	88,0 ± 4,6	5,24	2,3

NOTA: n = 8; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica

TABELA 22: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDOMATRIZ SALIVA, DIA 2

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR(%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,5 ± 0,4	7,23	9,2
	Fenobarbital	50	53,2 ± 2,9	5,42	6,4
	Topiramato	2,5	2,7 ± 0,1	2,91	7,2
CQB	Fenitoína	15	14,4 ± 0,5	3,32	4,0
	Fenobarbital	150	142,3 ± 4,4	3,08	5,1
	Topiramato	10	8,7 ± 0,4	4,54	2,7
CQM	Fenitoína	200	216,9 ± 10,2	4,68	8,4
	Fenobarbital	1200	1197,1 ± 58,2	4,86	0,2
	Topiramato	90	90,1 ± 5,0	5,52	0,1
CQA	Fenitoína	400	407,5 ± 10,0	2,45	1,9
	Fenobarbital	1800	1781,4 ± 53,1	2,98	1,0
	Topiramato	230	232,9 ± 8,3	3,57	1,3
CQD	Fenitoína	200	198,8 ± 2,9	1,44	0,6
	Fenobarbital	1200	1220,0 ± 53,9	4,41	1,7
	Topiramato	90	89,9 ± 4,7	5,20	0,1

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica.



TABELA 23: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA UTILIZANDO MATRIZ SALIVA, DIA 3

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> Exatidão (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,1 ± 0,4	8,65	2,8
	Fenobarbital	50	51,2 ± 1,9	3,81	2,4
	Topiramato	2,5	2,6 ± 0,1	3,90	2,3
CQB	Fenitoína	15	15,3 ± 0,5	3,30	1,7
	Fenobarbital	150	152,5 ± 4,6	2,99	1,7
	Topiramato	10	9,8 ± 0,2	2,36	1,6
CQM	Fenitoína	200	202,4 ± 8,9	4,40	1,2
	Fenobarbital	1200	1186,3 ± 23,8	2,00	1,1
	Topiramato	90	86,8 ± 5,6	6,45	3,5
CQA	Fenitoína	400	408,8 ± 9,4	2,29	2,2
	Fenobarbital	1800	1186,3 ± 23,8	2,01	1,1
	Topiramato	230	232,6 ± 9,8	4,22	1,1
CQD	Fenitoína	200	210,4 ± 2,0	0,93	5,2
	Fenobarbital	1200	1207,5 ± 74,6	6,17	0,7
	Topiramato	90	87,1 ± 5,8	6,70	3,2

NOTA: n=8; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica

TABELA 24: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS UTILIZANDO MATRIZ PLASMA

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,4 ± 0,2	3,75	8,8
	Fenobarbital	50	51,9 ± 1,9	3,59	3,8
	Topiramato	2,5	2,7 ± 0,1	2,89	5,9
CQB	Fenitoína	15	14,7 ± 0,5	3,65	1,6
	Fenobarbital	150	148,2 ± 5,0	3,36	1,2
	Topiramato	10	9,4 ± 0,4	4,20	6,3
CQM	Fenitoína	200	200,8 ± 7,1	3,51	0,4
	Fenobarbital	1200	1209,1 ± 46,9	3,88	0,8
	Topiramato	90	87,9 ± 3,9	4,39	2,3
CQA	Fenitoína	400	400,2 ± 10,2	2,54	0,1
	Fenobarbital	1800	1808,7 ± 40,5	2,24	0,5
	Topiramato	230	230,3 ± 4,8	2,11	0,1
CQD	Fenitoína	200	204,5 ± 8,5	4,14	2,3
	Fenobarbital	1200	1217,1 ± 47,4	3,89	1,4
	Topiramato	90	88,31 ± 4,3	4,83	1,9

NOTA: n=24; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica

TABELA 25: ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS UTILIZANDO MATRIZ SALIVA

Nível de Concentração das Amostras de Controle de Qualidade	Analito	Concentração Teórica (ngmL <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental (ngmL <sup>-1</sup> ) ± DP	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> EPR (%)
1 (LIQ)	Fenitoína	5	5,21 ± 0,30	5,72	4,4
	Fenobarbital	50	51,68 ± 2,21	4,27	3,4
	Topiramato	2,5	2,59 ± 0,09	3,67	3,5
CQB	Fenitoína	15	14,89 ± 0,57	3,84	0,7
	Fenobarbital	150	148,5 ± 6,24	4,20	1,0
	Topiramato	10	9,48 ± 0,65	6,85	5,2
CQM	Fenitoína	200	207,2 ± 10,08	4,86	3,6
	Fenobarbital	1200	1204,58 ± 45,96	3,82	0,4
	Topiramato	90	88,97 ± 3,80	4,27	1,1
CQA	Fenitoína	400	421,17 ± 21,71	5,15	5,3
	Fenobarbital	1800	1825,42 ± 57,33	3,14	1,4
	Topiramato	230	233,67 ± 7,03	3,01	1,6
CQD	Fenitoína	200	204,31 ± 8,94	4,38	2,2
	Fenobarbital	1200	1221,88 ± 55,28	4,52	1,8
	Topiramato	90	88,92 ± 4,60	5,16	1,2

NOTA: n=24; <sup>a</sup> Variação entre as áreas experimentais <sup>b</sup> Expressa sobre a concentração teórica

Pelos resultados, também se observa que as amostras submetidas a teste de diluição (CQD) apresentaram variações para precisão de 0,4% a 7,0% em plasma e de 0,4% a 6,7% para saliva. Já no ensaio de exatidão se teve uma variação de 96,0% a 105,2% para amostras em plasma e 96,8% a 105,2% para amostras em saliva.

O valores encontrados nos ensaios de precisão e exatidão para o CQD são equivalentes às variações apresentadas pelos demais controles, o que indica que se caso haja necessidade de avaliação de amostras em concentração superior ao

estabelecido pela linearidade do método, o sistema de diluição proposto será eficiente e confiável quando necessário.

#### 5.4.7.1 Estabilidade de Curta Duração, Pós-Processamento, após Ciclos de Congelamento e Descongelação e de Longa Duração

O teste de estabilidade objetiva avaliar se os analitos se mantêm estáveis durante todo período de análise e armazenamento da amostra. Para avaliação de Estabilidade de Curta Duração, Pós-Processamento, após Ciclos de Congelamento e Descongelação e de Longa Duração, foi avaliada a porcentagem em área dos sinais dos analitos em matriz de plasma e saliva após armazenamento em relação com o sinal dos mesmo analitos em amostras recém preparadas também em matriz. Pode-se observar pelas tabelas 26 e 27 que fenitoina, fenobarbital e topiramato após armazenamento por 6h em temperatura ambiente ( tempo máximo de preparo de um ensaio de doseamento), 24h e 48h em geladeira, ciclos de congelamento e descongelamento e armazenamento por 30 dias em freezer -40 °C permaneceram com variação de área inferior a 10% em relação às soluções recém preparadas, demonstrando que estes analitos não tem sua concentração alterada quando armazenados na sua forma já preparada, em matrizes de plasma ou saliva. Porém, a prednisona, o PI do método, demonstrou um decaimento médio de 23,0% na avaliação de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, permanecendo constante nas demais condições de armazenamento avaliadas tanto em saliva quanto plasma. Isto indica que o padrão interno deve ser adicionado na amostra apenas no momento da análise, ou quando a mesma não necessitará passar por processos de congelamento e descongelamento.

TABELA 26: ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO DOS ANALITOS EM MATRIZ PLASMA.

Concentração das Amostras	Analito	Curta duração (6 horas)		Pós- Processamento (24 horas)		Ciclo de Congelamento e Descongelamento		Longa Duração	
		<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%
CQB	Fenitoína	98,5 ± 1,3	1,32	97,1 ± 2,3	2,37	94,9 ± 2,9	3,06	97,8 ± 4,3	4,40
	Fenobarbital	97,9 ± 2,1	2,15	96,9 ± 3,8	3,92	93,8 ± 4,6	4,90	97,1 ± 3,9	4,02
	Topiramato	98,2 ± 1,9	1,93	98,1 ± 3,9	3,98	94,3 ± 3,5	3,71	98,3 ± 2,9	2,95
	Prednisona (PI)	99,0 ± 1,2	1,21	97,0 ± 4,1	4,23	75,4 ± 1,8	2,39	97,5 ± 3,4	3,49
CQA	Fenitoína	99,2 ± 1,6	1,61	98,3 ± 6,1	6,21	95,1 ± 3,4	3,58	98,3 ± 1,9	1,93
	Fenobarbital	98,9 ± 2,2	2,22	97,5 ± 4,3	4,41	94,6 ± 3,8	4,02	97,6 ± 2,8	2,87
	Topiramato	98,8 ± 1,9	1,92	96,9 ± 3,4	3,51	95,7 ± 4,2	4,39	98,1 ± 3,9	3,98
	Prednisona (PI)	99,0 ± 1,2	1,21	95,9 ± 2,9	3,02	78,5 ± 2,6	3,31	96,1 ± 2,7	2,81

NOTA: n=6; <sup>a</sup>Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida das amostras fortificadas com soluções recém preparadas (100%); <sup>b</sup>Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

TABELA 27: ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO DOS ANALITOS EM MATRIZ SALIVA.

Concentração das Amostras	Analito	Curta duração (6 horas)		Pós- Processamento (24 horas)		Ciclo de Congelamento e Descongelamento		Longa Duração	
		<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%
CQB	Fenitoína	97,3 ± 2,2	2,26	97,9 ± 3,8	3,88	95,2 ± 3,1	3,26	96,9 ± 3,5	3,61
	Fenobarbital	98,1 ± 2,9	2,96	97,1 ± 2,3	2,37	94,5 ± 2,2	2,33	97,4 ± 3,1	3,18
	Topiramato	98,6 ± 3,3	3,35	98,0 ± 4,6	4,69	95,8 ± 4,7	4,91	97,9 ± 1,9	1,94
	Prednisona (PI)	97,9 ± 1,5	1,53	98,3 ± 1,9	1,93	77,1 ± 3,9	5,06	98,5 ± 4,1	4,16
CQA	Fenitoína	95,2 ± 3,6	3,78	96,3 ± 2,1	2,18	95,9 ± 2,0	2,09	99,1 ± 2,3	2,32
	Fenobarbital	97,8 ± 4,8	4,91	98,2 ± 3,8	3,87	95,6 ± 4,1	4,29	98,4 ± 3,4	3,46
	Topiramato	96,3 ± 5,9	6,13	98,7 ± 2,3	2,33	96,1 ± 3,2	3,33	97,9 ± 1,6	1,63
	Prednisona (PI)	97,0 ± 3,3	3,40	95,9 ± 5,3	5,53	77,1 ± 3,6	4,67	97,0 ± 4,1	4,23

NOTA: n=6; <sup>a</sup>Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida das amostras fortificadas com soluções recém preparadas (100%); <sup>b</sup>Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

#### 5.4.7.2 Estabilidade das Soluções Estoque e de Trabalho

Outro aspecto importante a ser avaliado é se os analitos são estáveis nas soluções estoque, também chamadas de soluções mãe e nas soluções de trabalho, também conhecidas como soluções intermediárias, afim de verificar se a concentração dos compostos é a mesma do início ao final do experimento e se as soluções podem ser armazenadas para facilitar análises futuras.

Durante o ensaio foram testadas as soluções estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup> de fenitopina, fenobarbital, topiramato e prednisona diluídas em metanol. Já para avaliação da estabilidade das soluções de trabalho foram utilizadas soluções na concentração de 10000 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 10000 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 10000 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 30000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) para os pontos de CQB e de 100000 ng mL<sup>-1</sup> de fenobarbital, 100000 ng mL<sup>-1</sup> de fenitoína, 100000 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato e 30000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona (PI) para os pontos de CQA, todas diluídas em acetonitrila.

Pelos resultados apresentados na TABELA 28 observa-se que fenitoína e fenobarbital permanecem com variação inferior a 10% tanto em solução estoque quando de trabalho quando armazenados por 6h em temperatura ambiente (tempo máximo de preparo de um ensaio de doseamento), 24h e 48h em geladeira, ciclos de congelamento e descongelamento e armazenamento por 30 dias em freezer -40°C. Já as soluções de trabalho de 10000 ng mL<sup>-1</sup> e 100000 ng mL<sup>-1</sup> de topiramato começaram a apresentar sinais de instabilidade a partir de 24 horas, chegando a ter menos de 20% da sua intensidade em solução recém preparada quando armazenado por 48 horas em geladeira. A solução trabalho de 30000 ng mL<sup>-1</sup> de prednisona, o padrão interno do método, também apresentou um decaimento significativo de cerca de 16% quando armazenada por 48 horas em geladeira. Porém, tanto topiramato quanto prednisona, quando armazenados em solução estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup> apresentaram uma estabilidade considerável, com decaimento inferior a 10% (TABELA 29). Esta diferença de estabilidade pode estar relacionada ao meio diluente das soluções, uma vez que os analitos são diluídos em metanol para preparo da solução estoque e posteriormente diluídos em acetonitrila para

preparo das soluções de trabalho. Assim, para padronização do método, sugere-se que para realização do método todas as soluções de trabalho sejam preparadas no momento da realização da análise a partir da solução estoque, que por sua vez, pode ser armazenada por 30 dias em freezer -40 °C.



TABELA 28: ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Concentração das Amostras	Analito	Armazenamento (6 horas)		Armazenamento (24 horas)		Armazenamento (48 horas)		Armazenamento (30 dias)	
		<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%
CQB	Fenitoína	98,3 ± 2,8	2,85	98,1 ± 3,5	3,57	97,9 ± 1,6	1,63	96,7 ± 3,5	3,62
	Fenobarbital	98,5 ± 4,3	4,37	97,2 ± 2,1	2,16	96,1 ± 3,5	3,64	95,2 ± 4,3	4,52
	Topiramato	97,8 ± 1,9	1,94	91,2 ± 4,9	5,37	20,5 ± 1,8	8,78	30,9 ± 2,5	9,71
	Prednisona (PI)	98,1 ± 3,6	3,67	96,0 ± 5,1	5,31	82,4 ± 4,9	5,95	92,3 ± 4,2	4,55
CQA	Fenitoína	97,7 ± 1,9	1,94	97,9 ± 1,8	1,84	96,9 ± 3,7	3,82	95,9 ± 2,1	2,19
	Fenobarbital	98,1 ± 2,3	2,34	96,9 ± 3,3	3,41	95,1 ± 2,6	2,73	94,8 ± 3,9	4,11
	Topiramato	98,4 ± 2,9	2,95	90,9 ± 5,1	5,61	15,7 ± 1,5	9,55	35,1 ± 3,0	7,12
	Prednisona (PI)	97,9 ± 4,2	4,29	94,8 ± 3,9	4,11	84,9 ± 4,7	5,54	90,8 ± 4,4	4,85

NOTA: n=6; <sup>a</sup> Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida de amostras analisadas com soluções recém preparadas (100%); <sup>b</sup> Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

TABELA 29: ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Concentração das Amostras	Analito	Armazenamento (6 horas)		Armazenamento (24 horas)		Armazenamento (48 horas)		Armazenamento (30 dias)	
		<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%	<sup>a</sup> Área % ± DP	<sup>b</sup> CV%
CQB	Fenitoína	98,2 ± 3,4	3,46	95,9 ± 2,8	2,92	97,2 ± 3,4	3,50	96,3 ± 2,8	2,91
	Fenobarbital	99,2 ± 1,3	1,31	98,2 ± 2,5	2,55	95,8 ± 4,1	4,28	98,7 ± 3,9	3,95
	Topiramato	97,2 ± 3,7	3,81	97,8 ± 3,2	3,27	92,4 ± 2,7	2,92	96,8 ± 1,5	1,55
	Prednisona (PI)	98,0 ± 2,2	2,24	99,1 ± 2,3	2,32	93,3 ± 1,8	1,93	98,5 ± 2,1	2,13
CQA	Fenitoína	99,1 ± 2,9	2,93	96,9 ± 3,2	3,30	97,1 ± 2,4	2,47	97,1 ± 2,4	2,47
	Fenobarbital	98,7 ± 1,5	1,52	96,1 ± 2,9	3,02	93,7 ± 4,4	4,70	98,1 ± 3,3	3,36
	Topiramato	98,1 ± 1,9	1,94	98,9 ± 1,3	1,31	91,9 ± 5,1	5,55	97,3 ± 4,1	4,21
	Prednisona (PI)	97,9 ± 3,8	3,88	97,7 ± 4,1	4,20	92,7 ± 4,9	5,29	98,4 ± 4,4	4,47

NOTA: n=6; <sup>a</sup> Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida de amostras analisadas com soluções recém preparadas (100%); <sup>b</sup> Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

## 5.5 CONCENTRAÇÃO DE TOPIRAMATO E ASSOCIAÇÕES EM PLASMA E SALIVA

Um dos principais objetivos do projeto seria a avaliação da concentração sérica de topiramato, e duas de suas principais associações em matriz de plasma e saliva, afim de correlacionar os dados obtidos e afirmar qual a relação existente entre as duas matrizes, e se seria possível a substituição da matriz plasmática pela salivar para ensaios de monitoramento terapêutico. Resultados preliminares encontrados na literatura demonstram que existe uma boa correlação, porém, em sua maioria, utilizam métodos pouco específicos, como FPIA, para a fenitoína e topiramato, separadamente, e cromatografia gasosa, para o fenobarbital.

Assim, dados apontam que para o topiramato a relação entre concentração plasmática/concentração salivar é em torno de 0,9 (MILES *et al.*, 2003), enquanto que para o fenobarbital é em torno de 0,5 (PATSALOS *et al.*, 2008) e para a fenitoína é próximo a 1,0 (PATSALOS *et al.*, 2013). Porém, em todos os casos eles utilizam dados obtidos a partir de métodos validados apenas para matriz plasmática, e com uma seletividade bem abaixo da alcançada pela espectrometria de massas. Além disso, a composição do plasma é bastante distinta, principalmente quando se trata de ligação de drogas a proteínas plasmáticas, o que pode alterar a concentração a ser encontrada na saliva, uma vez que ela tende a refletir a concentração plasmática livre, e não a total (CHOO; HUESTIS, 2004). Assim, como se tem uma ligação plasmática média de 15% para o topiramato (SCHNEIDERMAN, 1998), 55% para o fenobarbital (MAY, 2003; NELSON *et al.*, 1982) e 90% para a fenitoína (RICHENS, 1979), há de se considerar que talvez a relação concentração plasmática/salivar esperada seja diferente de 1.

O projeto está sendo realizado a partir de uma demanda específica do Hospital das Clínicas do Paraná. Médicos do setor de neurologia do hospital observaram que pacientes em tratamento com o topiramato apresentam uma alta incidência de cálculos renais, que pode estar relacionada com concentrações plasmáticas de fármaco acima das ideais para cada paciente,

seja por reflexo de associações de tratamento, seja por características intrínsecas de cada paciente.

Assim, estão sendo coletadas amostras de plasma e saliva de pacientes em tratamento com anticonvulsivantes e tem-se como perspectivas futuras quantificar os fármacos em associação nas amostras e disponibilizar um resultado seguro a respeito da concentração plasmática/salivar de topiramato, fenitoína e fenobarbital em cada paciente.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para quantificação de fenitoína, fenobarbital e topiramato em associação em matrizes de plasma e saliva, com excelentes resultados de precisão e exatidão. Para as análises de fenitoína, fenobarbital e topiramato foi alcançada uma precisão mínima de 92,5% para análises em plasma e de 91,3% para análises em saliva, considerando análises realizadas tanto no ensaio de precisão quanto as análises realizadas no ensaio de linearidade para os três analitos de interesse. Já em relação a exatidão, foi encontrado um desvio máximo de 11,4% do valor teórico esperado nas análises dos anticonvulsivantes em plasma e de 11,8% nas mesmas análises em saliva. Sendo portanto, considerado o método preciso e exato em ambas as matrizes. Nos ensaios de linearidade, foi alcançado um coeficiente de correlação mínimo de 0,9963 para as curvas realizadas durante três dias nas duas matrizes estudadas, demonstrando que os sinais gerados no analisador correspondem corretamente com o aumento de concentração proposto pela curva de calibração. Além disso, conseguiu-se manter uma mesma metodologia para a quantificação dos fármacos para ambas as matrizes, com limites de quantificação de cerca de 10% abaixo do esperado quando comparado com dados da literatura para a concentração plasmática e salivar, utilizando outros métodos de análise. Sendo assim, está sendo pela primeira vez, disponibilizado um método por Espectrometria de Massas no qual será possível afirmar a real correlação existente entre concentração plasmática e salivar para as associações de topiramato, fenitoína e fenobarbital.

Visando o monitoramento terapêutico a metodologia desenvolvida possibilitará que o delineamento de protocolos individualizados de tratamento de epilepsia se tornem mais rotineiros, uma vez que a coleta de saliva se mostra mais simples e mais aceita pelos pacientes do que a coleta de matrizes tradicionais. Outro fator importante a ser destacado é o fato do método analítico desenvolvido ser compatível com a rotina laboratorial, por ser simples, rápido e de baixo custo, uma vez que não necessita de etapas específicas, como extração em fase sólida ou secagem à vácuo.

Pontos importantes da metodologia desenvolvida também são a utilização de apenas 30  $\mu\text{L}$  de amostra para realização das análises, o que contribui para redução de efeito matriz e aumento da sensibilidade do método. Além disso, o volume pequeno de amostra necessário para realização das análises corrobora para o bem estar do paciente, uma vez que as coletas frequentes típicas do monitoramento terapêutico tendem a ser mais rápidas e fáceis com a coleta de pequenas quantidades.

## REFERENCIAS

ARNONE, D. Review of the use of Topiramate for treatment of psychiatric Disorders. **Annals of General Psychiatry**, v.4, 2005.

BANERJEEA,P.N.; FILIPPI, C.D.; HAUSERA, W.A.B. The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. **Epilepsy Research**, v.85, p.31-45, 2009

BAHRAMI, G.; MIRZAEI, S.; KIANI, A. Sensitive analytical method for topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B Analytical Technology in Biomedicine and Life Sciences**, v.813, p.175–180, 2004.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B. A novel high sensitivity HPLC assay for topiramate, using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as pre-column fluorescence derivatizing agent. **Journal of Chromatography Analytical Technology in Biomedicine and Life Sciences**, v.850, p.400–404, 2004.

BAHRAMI, G.; MIRZAEI, S.; MOHAMMADI, B.; KIANI, A. High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. **Journal of Chromatography Analytical Technology in Biomedicine and Life Sciences**, v. 822, p.322–325, 2005.

BAUMANN, R. Salivary Monitoring of Antiepileptic Drugs. **Journal of Pharmacy Practice**, v.20, p.147-157, 2007,

BERRY, D.; PATSALOS, P. Comparison of topiramate concentrations in plasma and serum by fluorescence polarization immunoassay. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.22, p. 460-464, 2000.

BRASIL, Portaria SAS/MS nº 492, de 23 de setembro de 2010. **Ministério da saúde**, 2010.

\_\_\_\_\_. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF: ANVISA 2012.

BRITZI, M.; SOBACK, S.; ISOHERRANEN, N.; LEVY, R.; PERUCCA, E.; DOOSE, D. R.; MARYANOFF, B.; AND MEIR BIALER, M. Analysis of Topiramate and Its Metabolites in Plasma and Urine of Healthy Subjects and Patients With Epilepsy by Use of a Novel Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Assay. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, p. 314–322, 2003.

BROWN, S.D.; WOLF, H.H.; SWINYARD, E.A. The novel anticonvulsant topiramate enhances GABA-mediated chloride flux. **Epilepsia**, v.34, 1993.

CACEK, A. Review of alterations in oral phenytoin bioavailability associated with formulation, antacids, and food. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.8, p.166-171, 1986.

CATALDI, T. R.; BIANCO, G.; ABATE, S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p.82-96, 2008.

CHANG-KEE, L.; GWYN, L. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. **Biological Pharmacy**, v.25, 2002.

CHIAPPIN, S.; ANTONELLI, G.; GATTI, R.; PALO, E. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v.383, 2007

CHOO, R. E.; HUESTIS, M. A.; Oral fluid as a diagnostic tool. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, p.1273–1287, 2004.

CHRISTENSEN, J.; HOJSKOV, C.; POULSEN, J. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for topiramate analysis in plasma and cerebrospinal fluid: validation and comparison with fluorescence polarization immunoassay. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.24, p. 658–664, 2002; 24

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-81, 2003.

DROBITCH, R.; SVENSSON, C. Therapeutic drug monitoring insaliva. An update. **Clinical Pharmacokinetics**, v.23, p. 365-379, 1992

ICH. Validation of Analytical Procedures: text and methodology. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Pharmaceuticals for Human Use**. p. 13, 2005.

EDGAR, W. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. **British Dentistry Journal**, v.169, p. 169-196, 1990.

EDGAR, W. Saliva: its secretion, composition and functions. **British Dentistry Journal**, v.172, p. 305-312, 1992

ECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effect. *Journal of Chromatography B, Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v.877, p.2198-2207, 2009

GARNETT, W.R. Clinical Pharmacology of Topiramate: A Review. **International League Against Epilepsy**, v.41, p. S61-S65, 2000.



GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n. 2, p.140-50, 2003.

GORODISCHER, R.; KOREN, G.; Salivary excretion of drugs in children: theoretical and practical issues in therapeutic drug monitoring. **Development Pharmacology Therapy**, v.19, p.161-177, 1992.

GORODISCHER, R., BURTIN, P.; HWANG, P.; LEVINE, M.; KOREN, G. Saliva versus blood sampling for therapeutic drug monitoring in children: patient and parental preferences and an economic analysis. **Therapy Drug Monitoring**, v.16, p. 437-443, 1994.

GOSWAMI, D.; KUMAR, A.; KHUROO, A. H; MONIF, T.; RAB, S. Bioanalytical LC-MS/MS method validation for plasma determination of topiramate in healthy Indian volunteers. **Biomedical Chromatography**, v.23, p. 1227-1241, 2009

GRANGER, P. Modulation of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin. **Molecular Pharmacology**, v.47, p. 1189–1196, 1995).

HIEMKE, C.; BAUMANN, P.; BERGEMANN, N.*et al.* AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. **Pharmacopsychiatry**, v.44, p.195-235, 2011.

HUMPHREY, S.; WILLIAMSON, R. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, p.162-169, 2001.

JACOBSON, E.; Salivary secretion. **Gastrointestinal Physiology**, v.2, p. 46-54, 1981.

JOHANNESSEN, S.; BATTINO, D.; BERRY D.*et al.* Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. **Therapy Drug Monitoring**, v.25, p.347-363, 2003.

JONES, M. Topiramate - safety and tolerability. **Canadian Journal of Neurological Science**, v. 25, p, 13-15, 1998.

KAMALI, F.; THOMAS, S. Effect of saliva flow rate on saliva phenytoin concentrations: implications for therapeutic monitoring. **Europe Journal of Clinical Pharmacology**, v.46, p.565-567, 1994.

KANG, J.; PARK, Y. S.; KIM, S.H.; KIM, S.H.; JUN, M.H. Modern Methods for Analysis of Antiepileptic Drugs in the Biological Fluids for Pharmacokinetics, Bioequivalence and Therapeutic Drug Monitoring. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, V. 15, p. 67 - 81, 2011

KIM, K.; AH.SEO, K., KIM, S.; BAE, S. Simple and accurate analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass

spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, p.771-777, 2011.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p.1357-67, 2005.

KRASOWSKI, M. Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications. Review. **Pharmaceuticals**, v.3, p.1909-1935, 2010.

LACERDA, G.; KRUMMEL, T.; SABOURDY, C.; RYVLIN, P.; HIRSCH, E. Optimizing therapy of seizures in patients with renal or hepatic dysfunction. **Neurology**, v.67, p. S28-S33, 2006.

MARCA, G. *et al*, 2008, Rapid assay of topiramate in dried blood spots by a new liquidchromatography-tandem massspectrometric method.**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1392–1396, 2008

MARQUET, P.; SAINT-MARCOUX, F.; SAUVAGE, F. Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. **Analises Bioanalytical Chemistry**. V.388, 2007.

MATTSON, R.; CRAMER, J.; COLLINS, J.*et al*. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone inpartial and secondarily generalized tonic-clonic seizures.**New England Journal of Medicine**, v.313, p.145-151, 1985.

MAY, T.; KORN-MERKER, E.; RAMBECK, B. Clinical pharmacokinetics ofoxcarbazepine. **Clinical Pharmacokinet**, v.42, p.1023–1042, 2003.

MILES, M.V.; TANG, P.H.; GLAUSER, T.A.; RYAN, M.A.; GRIM, S.A.Alternative to Serum Monitoring. **Pediatric Neurology**, v.29, p.143, 2003

MYLONAS, P.; MAKRI, M.; GEORGOPOULOS, N. *et al*. Adequacy of salivary 17-hydroxyprogesterone determination using various collection methods. **Steroids**, v.71, p.273-276, 2006

NAKAJIMA, M.; SAKATA, N.; OHASHI, N.*et al*. Involvement of multipleUDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms in glucuronidation of5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in human liver microsomes.**Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p.1250-1256, 2002.

NAYAK, R.K.; GISCLON, L.G.; CURTIN, D.A.; BENET, L.Z. Estimation of the absolute bioavailability of topiramate in humans without intravenous data.**Journal of Clinical Pharmacology**, v.34, p.1029, 1994

NEELS, H.; SIERENS, A.; NAELEERTS, K. SCHARPÉ, S.; HATFIELD, G. LAMBERT, W. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.42, p.1228-1255, 2004.

NELSON, E, POWELL JR, CONRAD K,*et al.* Phenobarbital pharmacokinetics and bioavailability in adults. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, p.141-148, 1982.

NEURVONEN, P. Bioavailability of phenytoin: clinical pharmacokinetic and therapeutic implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v.4, p.91-103, 1979.

NIESSEN, W. M. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p.179-97, 1999.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p.8-35, 2009.

NURKKA, A.; OBIERO, J.; KAYTHY, H.; SSCOTT, A. Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, p.357-361, 2003.

PATSALOS, P.; SANDER, J. Newer antiepileptic drugs: Towards an improved risk-benefit ratio. **Drug Safety**, v. 11, p. 37-67, 1994.

PATSALOS, P.; BERRY, D.; BOURGEOIS, B.*et al.* Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v.49, p.1239–1276, 2008.

PATSALOS, P., BERRY, D. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. **Therapy Drug Monitoring**, v.35, p.4-29, 2013.

PERUCCA, E. An introduction to antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 46, p.31-37, 2005.

PRIVITERA, MD. Topiramate: a new antiepileptic drug. **Annals of Pharmacotherapy**, v.31, p. 1164-1173, 1997.

RICHENS, A. Clinical pharmacokinetics of phenytoin. **Clinical Pharmacokinetics**, v.4, p.153-169, 1979.

ROGAWSKI, M.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, p.1-13, 2004

ROSENFELD, W. E. Topiramate: A Review of Preclinical, Pharmacokinetic, and Clinical Data. **Clinical Therapeutics**, v. 19, p.6, 1997

ROSENTHAL, E.; HOFFER, E.; BEN, H.; BADARNI, S., BENDERLY, A.; HEMLI, Y. Use of saliva in home monitoring of carbamazepine levels. **Epilepsia**, v.36, p.72-74, 1995

ROTH, G.; CALMES, R. Salivary glands and saliva. **Oral Biology**, v.1, p. 196-236, 1981.

RYAN, M.; GRIM, S.; MILES, M. *et al.* Correlation of lamotrigine concentrations between serum and saliva. **Pharmacotherapy**, v.23, p.1550-1557, 2003.

SCHMIDT, D.; KUPFERBERG, H. Diphenylhydantoin, Phenobarbital, and Primidone in Saliva, Plasma, and Cerebrospinal Fluid. **Epilepsia**, v.16,p.735-741,1975

SCHNEIDERMAN, J.H.;Topiramate: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Canadian Journal of Neurological Sciences**,v.25, p. S3-S5, 1998.

SCHUETZ, E. Induction of cytochromes P450. **Current Drug Metabolics**, v.2, p. 139-147, 2001.

SCHWARTZ, E.; GRANGER, D.; SUSMAN, E.; LAIRD, B. Assessing salivary cortisol studies of child development. **Child Development**, v.65, p.1503-1513, v.69, 998

SEVERT, L.; COULTER, D.A.; SOMBATI, S.; DE-LORENZO, R.J. Topiramate selectively blocks kainate currents in cultured hippocampal neurons. **Epilepsia**. v.36, 1995. Abstract.

SHORVON, S. Safety of topiramate: adverse eventsand relationshipsto dosing. **Epilepsia**, v. 37, p. 18-22, 1996.

SIUZDAK, G. *et al.* Mass spectrometry and viral analysis. **Chemical Biology**, v.3, n.1, p.45-8, 1996.

SMITH, A.; BRAUER, H.; CATALANO, G.; CATALANO, M. Topiramate overdose: A case report and literature review. **Epilepsy & Behavior**, v.2, p. 603-607, 2001.

SOMBATI, S.; COULTER, D.A.; DELORENZO, R.J. Effects of topiramate on sustained repetitive low Mg<sup>2+</sup>-induced seizure discharges in cultured neurons. **Epilepsia**, v.36, 1995. Abstract.

SUBRAMANIAN, M.; BIRNNAUM, A.; REMMEL, R. High-Speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Therapy Drug Monitoring**, v.30, n.3, p.347-356, 2008.

TENNISON, M.; ALI, I.; MILES, M.; D'CRUZ, O.; VAUGHN, B.; GREENWOOD, R.; Feasibility and acceptance of salivary monitoringof antiepileptic drugs via the US Postal Service. **Therapy Drug Monitoring**, v.26, p. 295-299, 2004.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

TIEN, E.; NEGISHI, M. Nuclear receptors CAR and PXR in the regulation of hepatic metabolism. **Xenobiotica**, v. 36, p.1152-1163, 2006.

TREVATHAN, E.; MEDINA, M.; MADRID, A. Antiepileptic drugs in developing countries. **Lancet**, v.351, p. 1210-1211, 1998.

WHITE, H.S.; BROWN, S.D.; SKEEN, G.A.; TWYMAN, R.E. The investigational anticonvulsant topiramate potentiates GABAevoked currents in mouse cortical neurons. **Epilepsia**. v. 36, Abstract.

VAN BRAMER, S. E. An introduction to mass spectrometry. ed. Chester: **Widener University**, 1997.

ZAABI, M.; DELEU, D.; BATCHELOR, C. Salivary free concentrations of anti-epileptic drugs: an evaluation in a routine clinical setting. **Acta Neurologica Belgica**, v.103, p.19-23, 2003.

ZHANG, B.; XIE, W.; KRASOWSKI, M. PXR: A xenobiotic receptor of diverse functions implicated in pharmacogenetics. **Pharmacogenomics**, v.9, p.1695-1709.

ZHOUA, S.; SONGB Q.; TANGB Y.; NAIDONGA, W. Critical Review of Development, Validation, and Transfer for HighThroughput Bioanalytical LC-MS/MS Methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.1, 2005.